

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**HELOÍZE DE SOUZA MILANO**

**Identificação de microrganismos do trato digestivo de pragas de cana-  
de-açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos  
lignocelulósicos e potencial de bioconversão de D-xilose em xilitol**

**Piracicaba  
2012**



**HELOÍZE DE SOUZA MILANO**

**Identificação de microrganismos do trato digestivo de pragas de cana-de-açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos lignocelulósicos e potencial para bioconversão de D-xilose em xilitol**

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Professor Dr. João Lúcio de Azevedo

**Piracicaba  
2012**

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Milano, Heloíze de Souza

Identificação de microrganismos do trato digestivo de pragas de cana-de-açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos lignocelulósicos e potencial para bioconversão de D-xilose em xilitol / Heloíze de Souza Milano; Orientador João Lúcio de Azevedo. - - Piracicaba, 2012.

112 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Enzimas (Atividade) 2. Microbiologia agrícola 3. Monossacarídeos (Produção) 4. Plantas produtoras de açúcar 5. Pragas de plantas I. Título

CDU 633.61:579.64

## **Dedico**

Ao meu querido Ralf, com amor, admiração e gratidão pela ajuda, compreensão, carinho e apoio incansável ao longo do período de elaboração deste trabalho, e na vida.

À minha querida mãe Nanci, e irmãs Tatiane e Caroline pelo incentivo, carinho e compreensão.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, meu orientador, pela oportunidade e admirável confiança em meu trabalho, agradeço muito pelo apoio;

Ao prof. Dr. Italo Delalibera Júnior, pela confiança, apoio, motivação e inestimável colaboração, sem a qual este trabalho não seria possível, os meus mais sinceros agradecimentos;

Ao prof. Dr. Luis Carlos Basso do Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras - ESALQ, pela colaboração para a realização dos ensaios fermentativos e avaliações de xilitol e etanol;

Ao pós-Dr. Marcelo Mendes Brandão do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas- ESALQ, pela colaboração nas análises moleculares;

Ao Dr. Humberto (Beto) do Laboratório de Genética de Leveduras - ESALQ, pela amizade e disponibilização dos equipamentos e material;

Aos colegas do Laboratório de Genética de Microrganismos Maria Letícia Bonatelli, Maria Caroline Quecine, Joelma Marcon e ao técnico José Antonio da Silva (Zezo) pela amizade e colaboração nos experimentos realizados (e por sempre me receberem tão bem);

Aos colegas do Laboratório de Patologia e Controle Microbiano, Endreus Delbaje, Nijima Novelo Jr., Janayne Rezende, John Salgarrida, Renata Simões, e à técnica do laboratório Solange Vieira, pela colaboração nos experimentos realizados nesse trabalho, e a todos os colegas do laboratório que ainda desenvolvem os projetos de pesquisas e aqueles já que passaram pelo lab. pela amizade e momentos de descontração;

Aos colegas Alda Lerayer e Rui Gomes, da Solazyme Brasil LTDA, por terem me apoiado e incentivado, e permitido que este trabalho acontecesse; aos colegas Amanda Macedo e Ricardo Honório pela compreensão e por terem segurado as pontas por mim;

Ao meu marido Ralf Vieira de Araujo, pela dissecação das larvas utilizadas, auxílio no planilhamento de dados, na montagem de tabelas, nas revisões e correções... obrigada por acreditar mais em mim que eu mesma!

Aos funcionários da secretaria da PPG-CENA, que sempre se empenharam em me ajudar, com tudo o que precisei nessa jornada;





## RESUMO

MILANO, H. 2012. 112 f. **Identificação de microrganismos do trato digestivo de pragas de cana-de-açúcar com atividade enzimática para degradação de substratos lignocelulósicos e potencial para bioconversão de D-xilose em xilitol.** Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

A necessidade de economias sustentáveis tem aumentado o interesse no desenvolvimento de plataformas microbianas para novos processos, tanto para a produção de biocombustíveis quanto para a síntese de compostos que demandam alta capacidade energética e processamento químico em sua produção. O isolamento de microrganismos, capazes de degradação de materiais lignocelulósicos, resistentes a diferentes inibidores e com rendimento elevado na biossíntese de moléculas específicas faz-se necessário para atender tais propósitos. Neste trabalho, microrganismos cultiváveis isolados do trato digestivo de larvas dos insetos pragas de cana-de-açúcar, besouro da raiz, *Migdolus fryanus*, bicudo da cana, *Sphenophorus levis*, broca-gigante da cana, *Telchin licus licus* e de broca-da-cana, *Diatraea saccharalis*, foram caracterizados quanto a atividade enzimática em fontes de carbono e identificados por técnicas moleculares. Larvas no terceiro instar de *M. fryanus* e *S. levis* e quinto instar de *T. licus licus* e *D. saccharalis* foram coletadas em plantios de cana-de-açúcar no interior de São Paulo. Um total de 341 microrganismos cultiváveis foram avaliados quanto a capacidade de degradação de substratos lignocelulósicos, como única fonte de carbono em meio sólido usando o índice de atividade enzimática (I.E.). Os isolados foram identificados por sequenciamento das regiões do 16S rRNA para bactérias, ITS rDNA para fungos e 26S rDNA para leveduras. Bactérias com atividade enzimática foram relacionadas aos gêneros do filo Firmicutes *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter*. Os isolados relacionados à *B. amyloliquefaciens* destacaram-se na degradação da celulose. Entre fungos filamentosos, leveduras e leveduriformes, a atividade enzimática foi destacada para a degradação da hemicelulose. Fungos filamentosos e leveduras pertencem ao filo Ascomycota e os leveduriformes ao filo Chlorophyta. Fungos que apresentaram hidrólise de xilano foram relacionados aos gêneros *Pyrenophora*, *Aspergillus* e *Penicillium*. As leveduras relacionam-se a nove gêneros, majoritariamente aos gêneros *Meryerozyma* e *Candida*. Leveduras com capacidade hidrolítica destacada foram relacionadas à *Meyerozyma guilliermondii*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida pseudointermedia*, *C. parapsilosis*, *C. solani* e *Aureobasidium pullulans*. Entre as leveduras, 40 isolados apresentam sequências que diferem em mais de 1% das sequências referência, podendo-se inferir a respeito de possíveis novas espécies. No ensaio cinético, realizado para a triagem de leveduras com capacidade de bioconversão da D-xilose em xilitol e etanol, o maior rendimento em xilitol foi demonstrado pelo microrganismo relacionado à *Prototheca zopfi* var. *hydrocarborea*. A capacidade desse organismo de produzir xilitol não havia sido descrita. Os resultados obtidos nesse trabalho, revelaram que o trato digestivo das pragas de cana-de-açúcar como uma fonte de microrganismos que apresentam capacidade de degradação enzimática para celulose e xilano cujo potencial para utilização na biotecnologia industrial ainda precisa ser revelado.

Palavras-chave: Microbiota intestinal. Pragas da cana-de-açúcar. Atividade enzimática. Materiais lignocelulósicos. Bioprodução de xilitol.



## ABSTRACT

MILANO, H. 2012. 112 f. **Identification of gut microorganisms in sugarcane pests, with enzymatic activity, for degradation of lignocelulosic substrates and bioconversion of D-xylose to xylitol potential.** Dissertation (Master in Science) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

The pursuit for sustainable economies has increased the interest in development of microbial-based platforms for new processes, both for biofuel production and for the synthesis of compounds, which demands high energetic capacity and chemical processing in its production. The isolation of microorganisms capable of degradation of lignocelulosic materials, resistant to different inhibitors and highly efficient in the biosynthesis of specific molecules is necessary to achieve such purposes. In this research, cultivable microorganisms isolated from the larval gut of sugarcane pests: sugarcane borer root *Migdolus fryanus*, sugarcane weevil *Sphenophorous levis*, giant sugarcane borer *Telchin licus licus* and sugarcane borer *Diathrea saccharalis*, were characterized according to their extracellular enzymatic activity in carbon sources and molecularly identified. Third-instar larvae of *Migdolus fryanus* and *S. levis* and fifth-instar larvae of *T. licus licus* and *D. saccharalis* were collected in sugarcane fields in São Paulo, Brazil. A total number of 341 strains were evaluated for their capacity of degradation of lignocelulitic substrates, as single carbon sources in solid medium. The enzymatic activities of the strains were estimated by Enzymatic Activity Index (EAI); further, the strains were molecularly identified by sequencing of the 16S rRNA region for bacteria; ITS rDNA region for filamentous fungi and 26S rDNA region for yeasts. Bacteria strains which presented enzymatic activity were related to Firmiculites genera *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia* and *Citrobacter*. Strains related to *B. amyloliquefaciens* have demonstrated higher levels of cellulosic degradation. Among filamentous fungi, yeasts and yeast-like organisms higher activity was showed to degradation of hemicelluloses. Filamentous fungi and yeasts belong to phylum Ascomycota, and the yeast-like organisms to phylum Chlorophyta. Six filamentous fungi which presented higher hidrolisys of xylan were related to *Pyrenophora*, *Aspergillus* and *Penicillium* genera. Yeasts were related mostly to the *Meryerozyma* and *Candida* genera. Yeasts with higher hydrolysis cababilities were reated to *Meyerozyma guilliermondii*, *Cryptococcus laurentti*, *Candida pseudointermedia*, *C. parapsilosis*, *C. solani* e *Aureobasidium pullulans*. Among the yeasts, 40 strains showed sequences that differ by more than 1% from reference sequences, which allows infering about possible new species. In the kinetic assay carried out for screening for yeasts capable of bioconverting D-xylose into xylitol and ethanol, higher yields of xylitol were obtained for the yeast-like organism related to *Prototheca zopfi* var. *hydrocarborea*. This microorganism's ability to produce xylitol had not been reported yet. The results obtained in this work have demonstrated the gut of sugarcane pests as source of microorganisms capable of enzymatic degradation of cellulose and xylan, whose potential for use in the industrial biotechnology has yet to be revealed.

Keywords: Gut microorganisms. Sugarcane pests. Enzymatic activity. Lignocelulosic materials. Xylitol bioproduction.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Frequências relativas de microrganismos cultiváveis isolados e testados para degradação de compostos lignocelulósicos .....	46
<b>Figura 2</b> – Frequências relativas dos gêneros identificados por sequenciamento das leveduras cultiváveis encontradas nos insetos.....	52
<b>Figura 3</b> – Relação entre total de leveduras isoladas e aquelas que apresentaram degradação positiva para compostos lignocelulósicos.....	53
<b>Figura 4</b> – Árvore filogenética obtida a partir de inferência bayesina para de isolados de leveduras e leveduriformes usando sequência da região D1/D2 do 26S rDNA ..	60
<b>Figura 5</b> – Degradação de celulose em leveduras e microrganismos leveduriformes isolados de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> , <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA .....	61
<b>Figura 6</b> – Degradação de xilano em leveduras e leveduriformes isolados de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> , <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA .....	62
<b>Figura 8</b> – Assimilação de D-xilose (●); produção de xilitol (o); produção de etanol (♦) e crescimento celular (×) para os isolados NRRL-Y (controle), L3, L4, L5, L7, L8, L9 e L11. ....	65
<b>Figura 9</b> – Assimilação de D-xilose (●); produção de xilitol (o) e crescimento celular (×) para os isolados L13, L15, L17, L20, L22, L24, L25 e L26. ....	66
<b>Figura 10</b> – Assimilação de D-xilose (●); produção de xilitol (o) e crescimento celular (×) para os isolados L31, L36, L37, L38, L39 e L45. ....	67



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Identificação por sequências de rDNA 16S de bactérias cultiváveis do mesêntero de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> e <i>Telchin licus licus</i> que apresentaram degradação de substratos lignocelulósicos.....	48
<b>Tabela 2</b> – Hidrólise in vitro de celulose e xilano por bactérias do trato digestivo de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> e <i>Telchin licus licus</i> .....	49
<b>Tabela 3</b> – Composição das comunidades de fungos filamentosos cultiváveis do mesêntero de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> , <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> identificadas por sequências da região ITS do rDNA .....	50
<b>Tabela 4</b> – Hidrólise in vitro de celulose e xilano por fungos filamentosos do trato digestivo de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> , <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> .....	50
<b>Tabela 5</b> – Leveduras cultiváveis do mesêntero de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> , <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA .....	53
<b>Tabela 6</b> – Hidrólise in vitro de celulose e xilano por leveduras do trato digestivo de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> , <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> ....	56
<b>Tabela 7</b> – Identidade dos organismos leveduriformes cultiváveis isolados de <i>Sphenophorus levis</i> identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA....	57
<b>Tabela 8</b> – Hidrólise in vitro de celulose e xilano por organismos leveduriformes do trato digestivo de <i>Sphenophorus levis</i> .....	57
<b>Tabela 9</b> – Unidades taxonômicas operacionais (UTOs)* para táxons definidos em <i>Diatraea saccharalis</i> , <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> e <i>Telchin licus licus</i> ....	59
<b>Tabela 10</b> – Unidades taxonômicas operacionais (UTOs)* definidas nas comparações entre sequências realizadas com isolados de <i>Diatraea saccharalis</i> , <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> e <i>Telchin licus licus</i> .....	59
<b>Tabela 11</b> – Produção de xilitol por grama de xilose e produtividade volumétrica das leveduras testadas para produção de xilitol .....	64
<b>Tabela 12</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências de isolados identificados como <i>Meyerozyma guilliermondii</i> pelo BLAST para isolados de <i>Migdolus fryanus</i> .....	95

<b>Tabela 13</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências de isolados identificados como <i>Meyerozyma guilliermondii</i> pelo BLAST para isolados de <i>Diatraea saccharalis</i> .....	93
<b>Tabela 14</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências de isolados identificados como <i>Meyerozyma guilliermondii</i> pelo BLAST para isolados de <i>Sphenophorus levis</i> .....	97
<b>Tabela 15</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências de isolados identificados como <i>Candida pseudointermedia</i> pelo BLAST para isolados de <i>Migdolus fryanus</i> .....	97
<b>Tabela 16</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências de isolados identificados como <i>Candida pseudointermedia</i> pelo BLAST para isolados de <i>Diatraea saccharalis</i> .....	98
<b>Tabela 17</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida intermedia</i> pelo BLAST para isolados de <i>Telchin licus licus</i> .....	98
<b>Tabela 18</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida intermedia</i> pelo BLAST para isolados de <i>Mygdolus fryanus</i> .....	98
<b>Tabela 19</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida intermedia</i> pelo BLAST para isolados de <i>Diatraea saccharalis</i> .....	98
<b>Tabela 20</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida intermedia</i> pelo BLAST para isolados de <i>Sphenophorus levis</i> .....	98
<b>Tabela 21</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida sorboxylosa</i> pelo BLAST para isolados de <i>Sphenophorus levis</i> .....	98
<b>Tabela 22</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candia tropicalis</i> pelo BLAST para isolados de <i>Diatraea saccharalis</i> .....	98
<b>Tabela 23</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida parapsilosis</i> pelo BLAST para isolados de <i>Telchin licus licus</i> .....	98
<b>Tabela 24</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida solani</i> pelo BLAST para isolados de <i>Telchin licus licus</i> .....	98
<b>Tabela 25</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Pichia sp.</i> pelo BLAST para isolados de <i>Telchin licus licus</i> .....	93
<b>Tabela 26</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Scheffersomyces sartinae</i> pelo BLAST para isolados de <i>Sphenophorus levis</i> .....	93
<b>Tabela 27</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Scheffersomyces sartinae</i> pelo BLAST para isolados de <i>Telchin licus licus</i> .....	93



<b>Tabela 28</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Tremella globispora</i> pelo BLAST para isolados de <i>Diatraea saccharalis</i> .....	93
<b>Tabela 29</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Cryptococcus laurentii</i> pelo BLAST para isolados de <i>Migdolus fryanus</i> .....	93
<b>Tabela 30</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida intermedia</i> pelo BLAST para isolados de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> .....	93
<b>Tabela 31</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida pseudointermedia</i> pelo BLAST para isolados de <i>Migdolus fryanus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> .....	93
<b>Tabela 32</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida tropicalis</i> pelo BLAST para isolados de <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> .....	93
<b>Tabela 33</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Candida tropicalis</i> pelo BLAST para isolados de <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> .....	93
<b>Tabela 34</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Aureobasidium pullulans</i> pelo BLAST para isolados de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> .....	93
<b>Tabela 35</b> – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como <i>Meyerozyma guilliermondii</i> pelo BLAST para isolados de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> .....	93



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>26</b>
2.1 Os microorganismos cultiváveis do trato gastrointestinal de insetos .....	26
2.2 Importância das leveduras cultiváveis do mesêntero .....	29
2.3 Bioconversão em produtos de alto valor agregado por microorganismos .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1 Origem das larvas de <i>Migdolus fryanus</i> , <i>Sphenophorus levis</i> e <i>Telchin licus licus</i> e <i>Diatraea saccharalis</i> .....	33
3.2 Dissecção das larvas.....	33
3.2.1 Isolamento de colônias.....	34
3.2.2.1 Obtenção e isolamento dos microorganismos cultiváveis do trato digestivo ...	34
3.2.2.2 Isolamento de leveduras cultiváveis de regurgitado e fezes de <i>Diatraea saccharalis</i> .....	35
3.3 Avaliação in vitro da produção de enzimas por microorganismos com a capacidade de degradar substratos celulósicos, hemicelulósicos e lignocelulósicos	36
3.3.1 Meios de cultivo utilizados.....	36
3.3.2 Verificação da atividade enzimática .....	36
3.3.3 Determinação da atividade enzimática.....	37
3.4 Extração e amplificação do DNA.....	38
3.4.1 Bactérias .....	38
3.4.2 Fungos filamentosos .....	39
3.4.3 Leveduras.....	40
3.5 Sequenciamento do DNA.....	41
3.6 Análise das sequências.....	42
3.7 Análises filogenéticas .....	43
3.8 Avaliação da conversão da xilose em xilitol e etanol.....	44
3.8.1 Ensaio fermentativo.....	44
3.8.2 Métodos analíticos.....	45
3.8.3 Fator de conversão de D-xilose em xilitol e (Y/ps) e Produtividade volumétrica de xilitol (Qp) .....	45
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>

4.1 Isolamento .....	46
4.2 A degradação enzimática de celulose, hemicelulose e lignina .....	47
4.2.1 Bactérias.....	47
4.2.2 Fungos filamentosos.....	49
4.2.3 Leveduras e organismos leveduriformes .....	51
4.3 Análise filogenética das leveduras e organismos leveduriformes.....	58
4.4 Ensaio de conversão de xilose em xilitol ou etanol por leveduras e organismos leveduriformes .....	63
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>95</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O interesse em bioenergia tem aumentado exponencialmente nos últimos anos devido à necessidade de economias sustentáveis e ambientes limpos (LYND et al., 2008; SUN; SCHARF, 2010). Celulose e hemicelulose são as biomassas mais abundantes no planeta terra e, portanto, têm o maior potencial para resolver tanto as demandas energéticas quanto ambientais de bioenergia (KIM et al., 2008; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). A produção de etanol e outros biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica recebeu recentemente enorme atenção tanto na indústria como nas comunidades acadêmicas em geral, e grandes progressos foram feitos na produção e utilização de biocombustíveis (BADGER, 2002; SANDERSON, 2006; SUN; SCHARF, 2010; LYND et al., 2008).

O processo convencional de produção de bioetanol utiliza a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido às suas vantagens, por exemplo, altos rendimentos de conversão de etanol a partir da glicose e tolerância à concentrações elevadas de álcool (ALPER; STEPHANOPOULOS 2009; PISKUR et al., 2006). No entanto, o aumento da concentração de açúcares e de componentes aromáticos na conversão industrial da lignocelulose em etanol, bem como outras condições adversas, podem causar danos à *S. cerevisiae* e restringir as suas aplicações (ALPER; STEPHANOPOULOS, 2009). Assim, o isolamento de microrganismos ideais, com capacidade para degradar diferentes materiais lignocelulósicos, resistir a diferentes inibidores e com rendimento elevado na biossíntese de moléculas específicas têm um papel importante no desenvolvimento de sistemas de produção de biocombustíveis (ALPER; STEPHANOPOULOS 2009; LEITE et al., 2003; LYND et al., 2008).

Diversos insetos, como cupins, baratas que se alimentam de madeira, besouros e formigas cortadeiras, entre outros, podem usar substratos lignocelulósicos, como sua principal fonte de alimentação e são altamente eficientes na degradação da celulose em glicose como fonte de energia (SUN; ZHOU, 2009). Como a dieta da maioria dos artrópodes é composta, basicamente de material vegetal, a digestão de polissacarídeos estruturais é essencial para o metabolismo energético e a capacidade de obtenção de carbono destas fontes contribui significativamente para o sucesso do filo. Estes polissacarídeos são resistentes à

degradação, e os insetos sozinhos não secretam todas as enzimas digestivas para hidrolisar as  $\beta$  - ligações dos polímeros. Pelo contrário, grande parte da hidrólise desses polissacarídeos é realizada por enzimas produzidas pelos simbiossiontes microbianos presentes no trato digestivo (BRUNE; FRIEDRICH, 2000; CAZEMIER et al.; SUH et al., 2003; WENZEL et al., 2002).

O trato gastrointestinal de insetos torna-se, assim, uma importante fonte para a prospecção de novos microrganismos e enzimas que possam auxiliar na decomposição de várias moléculas. A microbiota gastrointestinal dos artrópodes consiste em um biótopo complexo constituindo de membros residentes e transitórios de protozoários, fungos, bactérias e Archaea, tanto de patógenos como de mutualistas obrigatórios. Ela é resultado do contato entre o inseto e o ambiente externo; a riqueza e a abundância relativa das espécies que a constituem está, provavelmente, relacionada à estrutura do trato digestivo, ao pH, à condição redox, o hábito alimentar e às enzimas digestivas relacionadas (BIGNELL; EGGLETON, 1995; VISÔTTO, 2007).

A microbiota exerce uma função fundamental, já que o perfil metabólico da digestão dos insetos pode ser definido pelas relações simbióticas com microrganismos, podendo contribuir para a transformação de macromoléculas em nutrientes essenciais (CAMPBELL, 1990; VISÔTTO, 2007; SALDARRIAGA, 2009). Em alguns insetos o tubo digestivo apresenta câmaras com características distintas de pH, nível de oxigênio e populações de microrganismos que podem funcionar como reatores; contribuindo para produção de energia e decomposição de material lignocelulósico, como observado em cupins e besouros que vivem no tronco de árvores e se alimentam de material rico em celulose.

Embora alguns insetos produzam celulasas, acredita-se que os microrganismos do tubo digestivo tenham um papel importante na quebra de lignina e celulose, especialmente em insetos cuja dieta é pobre em nitrogênio e rica em fibras. Estes microrganismos podem ter utilização, por exemplo, na produção de glicose a partir de bagaço de cana, para produção de etanol. Este fato é importante uma vez que a produção de enzimas por microrganismos tem grande potencial e está diretamente relacionada com a mudança da dependência de recursos não renováveis de alto custo, como o petróleo (LYND et al., 1991).

A procura por novas matérias-primas renováveis para a produção de energia e alimentos gerou um grande interesse na hidrólise enzimática de materiais

lignocelulósicos. A vantagem principal desta hidrólise enzimática reside no fato da reação poder ser realizada em condições relativamente moderadas; não requerendo temperaturas e pressões altas ou valores de pH extremos. Também o processo é mais específico, sem a decomposição dos açúcares produzidos (STERNBERG; DORVAL, 1979). Entretanto, a tarefa de desenvolver um processo biotecnológico economicamente viável para a produção de açúcares fermentáveis a partir de materiais lignocelulósicos não é fácil. Não obstante, a pesquisa intensiva durante os últimos anos conduziu a uma maior compreensão da bioquímica da hidrólise enzimática. Embora alguns detalhes ainda não sejam compreendidos, as características principais do processo são conhecidas.

A digestão de celulose é realizada por uma mistura de enzimas com diferentes especificidades: (1)  $\text{exo-}\beta$  glicanases, as quais clivam unidades de celobiose nas cadeias finais não redutoras presentes na celulose cristalina; (2)  $\text{endo-}\beta$  glicanases, que clivam aleatoriamente ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas presentes nas cadeias de celulose e (3)  $\beta$ -glicosidases, responsáveis pela hidrólise de celobiose e pequenas oligocelodextrinas a glicose (TERRA; FERREIRA, 1994). Tanto os insetos herbívoros como microrganismos simbióticos podem secretar enzimas celulolíticas para a desconstrução e hidrólise de biomassa (OHKUMA, 2003; SUN; ZHOU, 2009; TOKUDA; WATANABE, 2007; WARNECKE et al., 2007). Apesar da controvérsia sobre qual organismo desempenha o papel mais importante para a quebra da biomassa – simbiontes ou inseto hospedeiro em si – a importância dos microrganismos simbióticos foi recentemente estabelecida por vários estudos realizados a nível genômico.

O xilano é o segundo principal constituinte da fração hemicelulose presente na parede celular de plantas (TAN et al., 2008). O xilano é constituído por uma cadeia principal de resíduos  $\beta$ -xilopirranose, que é frequentemente substituída por unidades  $\alpha$ -arabinofuranose e ácido metilglicurônico. Quando ingerido pelo inseto, esse polissacarídico complexo é hidrolisado pela enzima  $\text{endo-1,4 } \beta$ -xilanase em monômeros de açúcar para a realização do metabolismo. A degradação completa desse polissacarídeo complexo depende de enzimas atuando em sinergia:  $\text{endo-1,4 } \beta$ -xilanases hidrolisam as  $\beta$ -1,4-ligações entre os resíduos de D-xilose na cadeia principal, produzindo xiloligossacarídeos e  $\beta$ -D-xilosidases convertem xiloligossacarídeos a monômeros de xilose (BRECCIA et al., 1998; DEN HANN; VAN ZYL, 2003). Em besouros *Odontotaenius disjunctus* e *Verres sternbergianus*

demonstrou-se que leveduras simbióticas do trato digestivo como *Pichia stipitis*, *P. segobiensis*, *Candida shehatae* e *C. ergatensis* promovem a fermentação da xilose (SUH et al., 2003). O fato tem despertado um intenso interesse na utilização biotecnológica desses organismos para a fermentação da xilose em resíduos com alto conteúdo desse sacarídeo para a produção de etanol (BIELY; KREMICKY, 1998; JEFFRIES; KURTZMAN, 1994; JEFFRIES; JIN, 2000; WARD; SINGH, 2002; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA 1998).

O potencial das xilanases para uso em processos industriais de utilização de biomassa levou a construção de bibliotecas genômicas de DNA microbiano isolado de tratos intestinais de insetos das ordens Isoptera (cupins) e Lepidoptera (BRENNAN et al., 2004). Essas bibliotecas foram avaliadas para genes que codificam proteínas com atividade de xilanase e várias novas xilanases com seqüências primárias e novos domínios com funcionalidade desconhecida foram descobertos. Leveduras relacionadas ao gênero *Pichia sp.* apresentaram excelente performance para a produção de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado, reforçando o trato gastrointestinal de insetos como uma fonte de prospecção biotecnológica para espécies de leveduras economicamente importantes (SREENIVAS et al., 2007a).

A lignina constitui um polímero aromático de unidades de álcoois fenilpropanóicos encontrado em qualquer planta vascular (MESHITSUKA; LSOGAY, 1996). Todavia, a lignina não apresenta uma estrutura definida (RALPH, 1996). Hatfield, Ralph e Grabber (1999) definiram a lignina de modo independente da estrutura química, como uma macromolécula derivada de fenol (polímero) que interage com outros polímeros da parede celular para promover uma integridade estrutural, resistência à degradação e impermeabilidade à água. A lignina é capaz de proteger as plantas da maioria das formas de ataque microbiano, uma vez que sua quebra libera fenóis e outros produtos químicos que inibem o processo fermentativo. Recentes pesquisas evidenciam a degradação de lignina no intestino de duas espécies xilófagas não relacionadas, o besouro asiático *Anoplophora glabripennis* e o cupim *Zootermopsis angusticollis*. Embora não se tenha estabelecido a taxa de degradação da lignina ou se identificado genes específicos ou organismos responsáveis por esta degradação, modificações significativas na lignina da madeira foram detectadas após a passagem pelo trato gastrointestinal desses insetos (GEIB et al., 2008).



Nesse contexto, a caracterização da microbiota gastrointestinal daquelas espécies que se alimentam de substrato rico em lignocelulose usando técnicas convencionais e moleculares faz-se necessária uma vez que o conhecimento da diversidade de gêneros presentes pode revelar microrganismos com características desejáveis para incorporação em processos industriais, objetivando a decomposição de resíduos ricos em celulose.

Os insetos estudados neste trabalho pertencem à Ordem Lepidoptera e Coleoptera, os dois maiores grupos em número de espécies. A Ordem Coleoptera corresponde a cerca de 40 % das espécies da classe Insecta, com cerca de 300.000 espécies já descritas (GALLO et al., 2002). A Ordem Lepidoptera é o segundo maior grupo com mais de 150.000 espécies (BUZZI, 2002). Esses grupos apresentam importantes espécies consideradas pragas agrícolas. Atualmente, ambos os grupos de insetos são objetos de estudos que podem resultar em descobertas de importância para a agricultura e a indústria.

As espécies cuja microbiota simbiótica foi estudada *Migdolus fryanus* (besouro da raiz), *Sphenophorus levis* (bicudo), *Telchin licus licus* (broca-gigante) e *Diatraea saccharalis*, (broca-da-cana) são pragas importantes de cana-de-açúcar.

O besouro da raiz da cana-de-açúcar *M. fryanus* (Coleoptera: Cerambycidae), é uma das principais pragas dessa cultura, encontrado principalmente, no Centro-sul da América do Sul, nas regiões de solo arenoso (KASTEN et al. 1985; TERÁN; NOVARETTI; KASTEN, 1983). O comportamento subterrâneo das larvas que podem atingir até 4 a 5 metros de profundidade e o ciclo biológico muito longo traz dificuldades para estudos de biologia e da flutuação populacional. Dessa forma, o que se conhece sobre esse inseto refere-se apenas aos primeiros 60 cm de profundidade no solo (ARRIGONI et al., 1986; TERÁN; NOVARETTI; KASTEN 1984). Concomitantemente, em função da dificuldade de realizar estudos nas camadas mais profundas, presume-se que as informações até agora obtida sobre o inseto sejam ainda incompletas.

O bicudo da cana-de-açúcar, *S. levis* (Coleoptera: Curculionidae), é uma importante praga dos canaviais no estado de São Paulo. Os danos são causados pelas larvas que abrigam-se no interior do rizoma e danificam os tecidos. Em consequência pode ocorrer a morte da planta e falhas nas brotações das soqueiras, com perdas de 20 a 30 toneladas de cana/ha/ano, além de reduzir a longevidade do canavial (LEITE et al., 2005).

A broca gigante, *T. licus licus* (Lepdoptera: Castiniidae) danifica a cana abrindo galerias de baixo para cima até 1/3 da altura do colmo da cana, deixando-o oco, causando perdas na produção agrícola e industrial. Quando acaba a reserva no colmo, a larva migra para outro fazendo nova galeria de baixo para cima podendo danificar as touceiras resultando em falhas na brotação e em casos de altas infestações, necessidade de reforma do canavial. Causa também o conhecido “coração morto” na fase de brotação das soqueiras. O clima influencia o aumento populacional, sendo que melhores distribuições de chuva favorecem o ataque (BENEDINI; CONDE 2008).

A broca-da-cana, *D. saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) é a principal praga de cana-de-açúcar no Brasil. As fêmeas ovipositam, preferencialmente, na parte dorsal das folhas. As lagartas recém eclodidas raspam as folhas e quando atingem o segundo ínstar penetram no colmo, abrindo galerias (PARRA, 1993). Uma infestação no início da cultura (canas de até quatro meses de idade) pode danificar a região meristemática da planta causando o sintoma conhecido como “coração morto”, resultando em falhas nos canaviais (BRAGA, 2001). Além dos prejuízos diretos causados como perda de peso, morte das gemas e aberturas de galerias nos colmos, a broca causa prejuízos indiretos ainda mais significativos, devido à penetração de microrganismos (especialmente os fungos *Fusarium moniliforme* e/ou *Colletotrichum falcatum*) causadores de podridões, que degradam a sacarose diminuindo a pureza do caldo e, conseqüentemente, reduzindo o rendimento da produção de açúcar (GALLO et al., 2002).

Por estarem associadas a cultura da cana-de-açúcar, o trato gastrointestinal desses insetos praga é uma rica fonte de prospecção biotecnológica de novas linhagens de microrganismos com potencial para degradação de substratos celulósicos, hemicelulósicos e lignocelulósicos podendo ser explorada para busca de novos biocatalizadores naturais.

Considerando a provável atividade celulolítica, hemicelulolítica e lignolítica de microrganismos isolados em pragas que se alimentam de cana-de-açúcar, o estudo descrito a seguir objetivou: (a) indentificar os microrganismos cultiváveis do trato intestinal de larvas de pragas de cana-de-açúcar *Migdolus fryanus* (besouro da raiz), *Sphenophorus levis* (bicudo da cana), *Telchin licus licus* (broca-gigante) e *Diatraea saccharalis* (broca-da-cana), caracterizando a capacidade destes em degradar substratos celulósicos, hemicelulósicos e lignocelulósicos; (b) analisar a diversidade

filogenética das leveduras isoladas associadas aos insetos citados utilizando a região D1/D2 da subunidade 26S rDNA (c) avaliar o potencial de bioconversão de D-xilose em xilitol e etanol de leveduras selecionadas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Os microorganismos cultiváveis do trato gastrointestinal de insetos

Devido a sua contínua exposição ao ambiente externo, o trato intestinal dos insetos abriga uma ampla variedade de microrganismos. Uma vez no intestino, os microrganismos podem crescer, ser lisados por enzimas ou excretados (WALKER; GLEN; SHEWRY, 1999). Uma parte dos microrganismos é transiente sendo ingerida com o alimento e outros residem no trato digestivo. Estes últimos exercem papéis importantes, ajudando a definir as características metabólicas em insetos e contribuindo para o compartilhamento eficiente de nutrientes derivados (BRENNAN et al., 2004; VISÔTTO, 2007).

Já em 1960, Steinhaus destacava os microrganismos como componentes importantes para a compreensão de aspectos envolvendo a bioquímica e fisiologia dos insetos. Os primeiros estudos realizados sobre simbiose inseto-bactéria consideraram apenas a relação entre inseto e microrganismo patogênico e a conseqüente produção de inseticidas microbianos. Posteriormente, as interações simbióticas nutricionais entre inseto-microrganismo passaram a ser amplamente pesquisadas em vários sistemas (BREZNAK; BRUNE, 1994; CRUDEN; MARKOVETZ, 1979; SCHULTZ; BREZNAK, 1978; DOUGLAS; MINTO; WILKINSON, 2001; GENTA et al., 2006).

Simbiontes contribuem para reprodução, digestão, nutrição e produção de feromônio (CAMPBELL, 1990; DASCH; WEISS; CHANG, 1984), podendo ainda detoxificar compostos (DOWD, 1992) atuando para quebrar a resistência de plantas (KROKENE; SOLHEIM, 1998). Outras funções são a prevenção de entrada de bactérias e fungos patogênicos e a produção de semioquímicos importantes nas interações entre insetos, sendo estes, em alguns casos, usados como feromônios de agregação (BRAND et al., 1975). Possíveis funções relacionadas à nutrição incluem fixação de nitrogênio, reciclagem de ácido úrico, metanogênese e acetogênese a partir de hidrogênio ( $H_2$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e a digestão de celulose e lignina (BRIDGES, 1981; OHKUMA; KUDO, 1996; AYRES et al., 2000).

Sabe-se que a contribuição nutricional da microbiota intestinal pode ocorrer de várias formas proporcionando ao inseto maior habilidade de sobrevivência em condições de dietas subótimas, o aumento da eficiência da digestão, a aquisição de enzimas digestivas e o abastecimento de vitaminas (DILLON; DILLON, 2004). Quando as baratas mudam de uma dieta de baixa proteína para uma dieta rica em fibras, há uma diminuição no número de estreptococos e lactobacilos que habitam o intestino anterior (estomodeu) com uma diminuição concomitante na produção de lactato e acetato (KANE; BREZNAK, 1991). Da mesma forma, uma dieta rica em celulose provoca um aumento na população de protozoários no intestino posterior (proctodeu) da barata americana, *Periplaneta americana* (GIJZEN et al., 1994).

Estes mecanismos reguladores podem operar ao nível do citoplasma, controlando a atividade enzimática envolvida, segundo a natureza da molécula enzimática e do substrato onde os microrganismos estão crescendo (MONOD; CHANGEUX; JACOB, 1963). Este tipo de controle é útil aos microrganismos, pois regula a síntese das enzimas a nível genético, controlando sua produção de acordo com as condições do ambiente. Isto é alcançado, por meio de mecanismos reguladores como indução e repressão (JACOB; MONOD, 1961), evitando produção e gasto de energia desnecessários.

Recentes pesquisas no campo da endossimbiose têm enfatizado a interação entre microrganismos e seu hospedeiro na utilização de moléculas complexas, como celulose (WATANABE; TOKUDA, 2010). A capacidade para degradar a celulose é amplamente distribuída entre vários gêneros de eubactérias e fungos (MATTANOVICH et al., 2009). Por exemplo, os microrganismos associados ao trato digestivo das diversas espécies de cupins são essenciais para a sobrevivência desses insetos por serem fontes potenciais de enzimas que degradam celulose e lignina, fornecendo aos seus hospedeiros glicose e ácidos graxos que serão utilizados como fonte de energia. Espiroquetas fornecem carbono, nitrogênio e energia necessários para a nutrição de cupins via acetogênese e fixação de nitrogênio (BREZNAK, 2002). Novas xilanases com sequências primárias não usuais e novos domínios de funcionalidade desconhecida foram descobertas numa análise realizada com métodos independente de cultivo em tratos intestinais de insetos das ordens Isopetra e Lepdoptera (BRENNAN, et al., 2004). A análise filogenética demonstrou uma diversidade considerável entre as sequências dessas enzimas e outras xilanases conhecidas, sugerindo que são de origem microbiana.

Delalibera, Handelsman e Raffa (2005) documentaram a capacidade de degradação de carboximetilcelulose por uma bactéria relacionada a *Sphingobium yanoikuyae*, isolada do trato intestinal do besouro *Saperda vestita*. As densidades populacionais do microrganismo no trato intestinal variaram entre  $2.4 \times 10^5$  a  $3.6 \times 10^6$  UFC/ inseto, evidenciando-o como integrante nativo da microbiota de *S. vestita*. O mesmo estudo revelou forte atividade degradativa em dois isolados de fungos provenientes do intestino de adultos de *S. vestita*.

No trato intestinal do besouro *Tenebrio molitor*, Qi, Chen e Wang (2011) encontraram sete isolados bacterianos, pertencentes a vários grupos (Actinobacteria, Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria) com alta capacidade de degradação aeróbica de substratos lignocelulósicos. Os pesquisadores também mostraram que quando associados, os microrganismos apresentam poder de degradação 2-5 vezes maior que quando testados individualmente. De forma semelhante, bactérias capazes de promover a degradação da celulose isoladas do trato gastrointestinal de invertebrados como cupins, lesmas, lagartas e traças mostraram ser eficientes em conjunto com *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação de celulose a etanol (GUPTA et al., 2012).

O papel funcional da microbiota digestiva normal dos insetos, comparada à dos seus patógenos obrigatórios ainda é pouco explorada – o que explica, em parte, uma das dificuldades no reconhecimento dos benefícios dessa relação (DILLON; DILLON, 2004). Um entendimento pleno das complexidades dos biótopos gastrointestinal ainda é incompleto pois existem dificuldades associadas ao cultivo da miríade de microrganismos envolvidos e à descrição da fisiologia de cada espécie. Para a grande maioria das espécies de insetos-praga muito pouco ou nada se conhece sobre a diversidade e o papel funcional da microbiota digestiva (CAMPBELL, 1990).

Apesar dos estudos com culturas de simbioses serem úteis na determinação de quais são suas capacidades, estes podem não refletir o que realmente ocorre no estado natural do hospedeiro (sub ou super expressando o que realmente acontece). A capacidade dos simbioses em insetos tem sido estudada através do cultivo em substrato, detecção colorimétrica ou estudos de indução de enzimas. E apesar do uso de substratos biologicamente relevantes parecer mais apropriado, substratos indicadores tem sido muito úteis na determinação do espectro da atividade enzimática (VEGA; DOWND, 2005).

## 2.2 Importância das leveduras cultiváveis do mesêntero

Inúmeras associações entre animais invertebrados e microrganismos endossimbióticos foram descritas ao longo do século passado (BÜCHNER, 1965; NARDON; GRENIER, 1989). Invertebrados dependem dos microrganismos para várias funções metabólicas, incluindo a síntese de aminoácidos, vitaminas, lipídeos, esteróis e feromônios, a degradação de substratos nutricionais e a detoxificação de compostos inibitórios. Nos ecossistemas terrestres encontram-se associações simbióticas inseto-fungo contínuas que vão desde interações casuais em um habitat compartilhado até interações estritas, como endossimbiose obrigatória. Diversas associações entre fungos e insetos estão bem estabelecidas (ISHIKAWA, 2003). São abundantes os relatos de fungos ascomicetos e basidiomicetos intimamente associados a insetos fitófagos das ordens Coleoptera, Homoptera, Hemiptera, Isoptera e Lepidoptera (BLACKWELL; JONES, 1997; NARDON; GRENIER, 1989; SCHAFER et al., 1996; SUH et al., 2003; ZHANG; SUH; BLACKWELL, 2003). Os microrganismos afetam profundamente as habilidades dos insetos em utilizar recursos nutricionais intratáveis e a ocupar habitats que de outra forma estariam indisponíveis para eles (SUH et al., 2003).

Interações inseto-fungo, especialmente aquelas entre leveduras ascomicetos e uma ampla variedade de insetos é comum (VEGA; DOWD, 2005). O trabalho de Steamer e colegas que abrange mais de 30 anos e revelou associações generalizadas de leveduras e insetos em diferentes habitats especializados. Estes incluem espécies de leveduras cactofílicas e *Drosophila* (ANDERSON et al., 2003; LACHANCE; STARMER 1998;. STARMER; FOGLEMAN; LACHANCE, 1991) e *Metschnikowia* associadas a determinados visitantes florais, como besouros nitidulídeos e espécies de *Drosophila* (LACHANCE; BOWLES; STARMER, 2004; LACHANCE BOWLES; STARMER, 2003a,b, 2005; ROSA et al., 1999).

Mais recentemente, leveduras associadas a insetos têm sido descobertas no trato digestivo de muitos coleópteros que se alimentam de fungos, e este habitat é interessante, não apenas devido a sua elevada diversidade taxonômica, mas também pela possibilidade de que as leveduras participem em uma simbiose com o inseto não reconhecida anteriormente (NGUYEN et al., 2006). Uma levedura intimamente relacionada com *Pichia stipitis* do trato intestinal de indivíduos do

besouro *Odontotaenius disjunctus* coletados desde o leste até o meio-oeste dos EUA (mais da metade na área de distribuição desse besouro na América do Norte) indicando que as duas espécies estão estreitamente relacionadas. Membros do clado *P. stipitis* são notáveis entre as leveduras com capacidade de fermentar e assimilar a xilose (JEFFRIES; KURTZMAN, 1994; KURTZMAN, 1990). Resíduos de xilose formam a espinha dorsal do maior componente da parede celular, a hemicelulose e *P. stipitis* tem atraído ampla atenção em esforços para melhorar a fermentação de resíduos de plantas para uso como álcool combustível (JEFFRIES; JIN, 2000; NGUYEN et al., 2006; VAN DIJKEN et. al., 1986; WARD; SINGH, 2002).

Abordagens modernas para identificação de leveduras incluem análises de sequências em regiões selecionadas do DNA de genes ribossomais e regiões espaçadoras entre elas, da região D1/D2 do 26S rDNA, um fragmento de aproximadamente 600-650 pb. Tipicamente, linhagens da mesma espécie apresentam as sequências D1/D2 idênticas ou com menos de dois erros de correspondência (FELL et al. 2000). Para trazer uma perspectiva global das relações entre as espécies, Kurtzman e Robnett (1998) compararam as seqüências da região D1/D2 do 26S rDNA. Dados de DNA utilizando dessa seqüência revelaram que o trato intestinal dos insetos abriga uma espantosa diversidade de leveduras (LIM et al., 2005; SUH et al., 2005b; SUH, NGUYEN; BLACKWELL, 2005a).

## **2.3 Bioconversão em produtos de alto valor agregado por microrganismos**

Materiais lignocelulósicos são fontes abundantes de compostos orgânicos, apresentando grande potencial de uso como matéria-prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (KRISHNA; REDDY; CHOWDARY, 2001). No Brasil, um dos resíduos lignocelulósicos mais abundantes é o bagaço de cana-de-açúcar; que apresenta em sua composição 50 % de celulose, 25 % de hemicelulose e 25 % de lignina (PANDEY et al., 2000). Grande parte do bagaço de cana-de-açúcar é utilizada pela própria indústria como fonte de energia, mas há, entretanto, um razoável excedente desse material, o que motiva pesquisas visando seu aproveitamento. Uma potencial alternativa seria o emprego do bagaço de cana-de-



açúcar como matéria-prima para a produção de xilitol (SILVA et al., 1997). O xilitol é um poliol ( $C_5H_{12}O_5$ ) com poder adoçante semelhante ao da sacarose e superior ao de outros poliois como sorbitol e manitol. É encontrado como intermediário normal do metabolismo de carboidratos em mamíferos (ciclo do ácido glicurônico-xilulose) e também em pequenas quantidades em algumas frutas e legumes (HYVONEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982).

O xilitol pode ser produzido a partir de hidrolisados hemicelulósicos por redução química ou fermentação microbiana. A tecnologia atual para a produção comercial baseia-se na redução química da xilose ou hemicelulose, sob condições operacionais de elevada pressão e temperatura e separação e purificação do xilitol por métodos cromatográficos (AFFLECK, 2000; BRANCO, 2010). A via microbiológica de produção tem sido estudada como uma alternativa para a síntese química de xilitol. Acredita-se que a via microbiológica resulta em custos menores de produção quando comparada à via atualmente utilizada – conduzida em condições de temperatura e pressão brandas, portanto, com menor gasto de energia e rendimentos mais elevados, baixo custo de separação/purificação e efluentes mais limpos – e no consequente aumento no uso do xilitol e de seus benefícios (SREENIVAS et al., 2004, 2006, 2007c; BRANCO, 2010).

Diversas pesquisas têm sido direcionadas para uso de microrganismos na produção de xilitol por via fermentativa a partir de hidrolisados. Sabe-se que determinadas bactérias (YOSHITAKE et al., 1971, 1976), fungos (DAHIYA, 1991), e leveduras (LEATHERS; GUPTA, 1997; KIM; KIM; OH, 1997; SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2006; SREENIVAS et al., 2004, 2007b) são capazes de reduzir a xilose em xilitol como um primeiro passo do metabolismo da D-xilose (HEIKKILA et al., 1999). Entre os microrganismos, as leveduras são consideradas os melhores produtores de xilitol destacando-se o gênero *Candida* pela maior eficiência de conversão (BIER et al., 2007; LIMA; FELIPE; TORRES, 2003). *C. tropicalis* já foi caracterizada como uma linhagem promissora para produção de xilitol, devido à sua alta taxa de absorção de xilose e capacidade de produção de xilitol (GRANSTROM; ARISTIDOU; LEISOLA, 2002; SREENIVAS et al., 2004).

Leveduras produtoras de xilitol já foram isoladas do trato intestinal de diversas espécies de besouro (RAO; BHADRA; SHIVAJI, 2007; PRAKASHAM; RAO; HOB, 2009; SREENIVAS et al., 2011; SUH; BLACKWELL, 2005). No trato intestinal de mariposas do gênero *Conopomorpha* foram encontradas leveduras que

apresentaram alguma capacidade de metabolização do xilitol (THANH; HAI; LACHANCE, 2003, 2006). A prospecção de novos microrganismos no trato gastrointestinal de diferentes insetos pode revelar microrganismos com capacidade de produção de xilitol ainda não conhecidos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Origem das larvas de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis* e *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis*

Foram utilizadas 20 larvas no terceiro ínstar de *Mydgolus fryanus* e *Sphenophorus levis* coletadas, respectivamente, nas variedades de cana-de-açúcar RB867515 em Maracaí/SP (Usina Nova América) e variedade SP89-1115 coletadas em Iracemápolis/SP (Usina Iracema). Também foram coletadas 20 larvas no quinto ínstar de *Telchin licus licus*, na variedade SP80-3280 em Limeira/SP (Fornecedor Claudio Rosseti).

No caso de *Diatraea saccharalis*, foram utilizadas 64 lagartas no quinto ínstar coletadas em diferentes variedades de cana-de-açúcar, a saber: SP83-2847, RB83-5054, SP79-1011, RB84-5210 (Bocaina/SP - Usina Santa Cândida “Açúcar e Álcool Ltda”); RB86-7515, RB83-5054, RB93-5744, RB72-454, RB85-5453 (Tanabí/SP - Usina Guarani Açúcar e Álcool); SP80-0185, RB83-5054, SP81-3250, SP81-3250, RB72-454, SP91-1049, RB86-7515, RB85-5453 (Luiz Antônio/SP - Central Energética Moreno Açúcar e Álcool Ltda.); RB83-5054, SP81-3250 (Piracicaba/SP - ESALQ/USP) e de criação em dieta artificial do laboratório de Patologia de Insetos do Departamento de Entomologia e Acarologia da ESALQ/USP.

#### 3.2 Dissecação das larvas

As larvas foram processadas no Laboratório logo após a coleta para evitar a rápida decomposição da cana-de-açúcar pela ação de microrganismos como *Fusarium moliniforme* e *Colletotrichum falcatum*. Os insetos foram desinfetados superficialmente pela imersão em hipoclorito de sódio 2 % por um minuto sendo, após lavados por três vezes em água destilada esterilizada para a retirada de excesso de hipoclorito de sódio. A dissecação ocorreu em câmara de fluxo laminar usando tesouras de dissecação fina e pinças. O mesêntero foi disposto em 0,9 mL

solução fisiológica (NaCl 0,85 %) esterilizada e triturado com auxílio de micro-pistilo plástico para retirada dos microrganismos aderidos à parede do tubo digestivo.

### **3.2.1 Isolamento de colônias**

#### **3.2.2.1 Obtenção e isolamento dos microrganismos cultiváveis do trato digestivo**

O triturado obtido foi utilizado de duas maneiras: puro e após enriquecimento. O enriquecimento foi realizado utilizando-se uma alíquota do produto como inóculo em meio líquido base MS  $4,3 \text{ g L}^{-1}$  (Murashige, Sigma-Aldrich) contendo uma das fontes de carbono, conforme descritos por Gamundi e Steciow (1988): (a) celulose  $5 \text{ g L}^{-1}$  (Carboximetilcelulose, baixa viscosidade, Sigma-Aldrich); (b) lignina  $10 \text{ g L}^{-1}$  (Lignina alcalina, Sigma-Aldrich); (c) xilano  $5 \text{ g L}^{-1}$  (Xilano birchwood, Sigma-Aldrich). Também foi utilizado meio xilose composto por xilose  $20 \text{ g L}^{-1}$  (D-xilose Sigma-Aldrich), extrato de levedura  $6,7 \text{ g L}^{-1}$ , e cloranfenicol  $2 \text{ mg L}^{-1}$ .

Para obtenção das bactérias cultiváveis, foi realizado plaqueamento por superfície em meio ágar triptona de soja (TSA), em duplicata, utilizando uma alíquota de  $100 \text{ }\mu\text{L}$ . As placas foram incubadas a  $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 a 7 dias, dependendo da taxa de crescimento dos microrganismos.

Para obtenção das leveduras e fungos, uma alíquota de  $100 \text{ }\mu\text{L}$  do produto obtido na trituração foi utilizada para plaqueamento por superfície em meio ágar dicloran, rosa bengala e cloranfenicol DRBC (Difco), em duplicata. As placas foram incubadas a  $26 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 3 a 7 dias, dependendo da taxa de crescimento dos microrganismos.

As colônias obtidas foram categorizadas com base na morfologia e por observações microscópicas. Pelo menos uma colônia de cada isolado obtido foi armazenada a  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  ou  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  em solução de 10 % glicerol, para análises posteriores.

### 3.2.2.2 Isolamento de leveduras cultiváveis de regurgitado e fezes de *Diatraea saccharalis*

Este ensaio foi delineado a partir das observações realizadas por Saldarriaga (2009) durante as dissecações do trato digestivo de *D. saccharalis*. Saldarriaga não observou fibras de celulose na região do mesêntero, sugerindo que o inseto, poderia ter o auxílio da microbiota no processo de utilização desse material. Como foram recorrentes as observações de leveduras contaminantes, resistentes à antibióticos, na criação insetos de *D. saccharalis* em dieta artificial, propôs-se a caracterização dos microrganismos presentes também no regurgitado e fezes de larvas desse inseto.

Inicialmente, 10 toletes de cana-de-açúcar foram lavados e esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 120 °C e 1 atm, reduzindo assim a probabilidade de contaminação por organismos co-ocorrentes. Em câmara de fluxo laminar, cada tolete foi furado, com auxílio de uma broca, na região entrenós com distância mínima de 5 cm das extremidades. Em seguida, ambas as extremidades foram protegidas com fita adesiva.

Em cada tolete, uma larva no terceiro ínstar de *D. saccharalis* proveniente da criação de laboratório foi colocada em contato com o local e logo após a infestação, o furo foi bloqueado com tecido *voil* e os toletes incubados em BOD por 48 horas.

Para a coleta, os toletes foram desinfetados com hipoclorito de sódio, levados à câmara de fluxo laminar e abertos com o auxílio de uma faca. As larvas foram cuidadosamente removidas, desinfetadas superficialmente por imersão em hipoclorito de sódio 2 % durante um minuto e lavadas três vezes em água destilada esterilizada para a retirada de excesso de hipoclorito de sódio. As fezes e o regurgitado foram coletados diretamente das galerias criadas pela broca-da-cana e armazenados separadamente em microtubos contendo solução fisiológica (NaCl 0,85 %) esterilizada. Na sequência, os materiais foram triturados com auxílio de micro-pistilo plástico para retirada dos microrganismos aderidos.

Para obtenção das leveduras, uma alíquota de 100 µL do produto obtido na trituração foi utilizada para plaqueamento por superfície em meio ágar dicloran, rosa bengala e cloranfenicol DRBC (Difco), em duplicata. As placas foram incubadas a

26 °C por 3 a 7 dias, dependendo da taxa de crescimento dos microrganismos. As colônias obtidas foram categorizadas com base na morfologia e por observações microscópicas. Pelo menos uma colônia de cada material obtido foi armazenada a -20 °C ou -80 °C em solução de 10 % glicerol, para análises posteriores.

### **3.3 Avaliação *in vitro* da produção de enzimas por microrganismos com a capacidade de degradar substratos celulósicos, hemicelulósicos e lignocelulósicos**

#### **3.3.1 Meios de cultivo utilizados**

Todos os morfotipos isolados e identificados de cada larva de *M. fryanus*, *S. levis* e *T. licus licus* nas diferentes variedades e localidades foram testados quanto à capacidade de degradação de celulose, hemicelulose e lignina como fontes de carbono, em meio de cultivo sólido descritos por Gamundi e Steciow (1988).

Para avaliação da atividade celulolítica foi utilizado o meio composto por celulose 5 g L<sup>-1</sup> (Carboximetilcelulose, baixa viscosidade Sigma-Aldrich), meio base MS 4,3 g L<sup>-1</sup> (Murashige, Sigma-Aldrich) e ágar 20 g L<sup>-1</sup>. Para avaliação da atividade hemicelulolítica, foi utilizado meio composto por xilano 2 g L<sup>-1</sup> (Xilano, Birchwood. Sigma-Aldrich), meio base MS 4,3 g L<sup>-1</sup> (Murashige, Sigma-Aldrich) e ágar 20 g L<sup>-1</sup>. Para avaliação da atividade lignocelulolítica, foi utilizado meio com lignina comercial 10 g L<sup>-1</sup> (Lignina alcalina, Sigma-Aldrich), meio base MS 4,3 g L<sup>-1</sup> (Murashige, Sigma-Aldrich) e ágar 20 g L<sup>-1</sup>.

As bactérias testadas foram inoculadas em placas de Petri com meio ágar com adição de suplemento (fonte de carbono) e crescidas a 35 °C durante 18 horas. As leveduras e fungos foram testados em meio semelhante, porém com extrato de levedura 3 g L<sup>-1</sup> e cloranfenicol 50 ppm e as placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

#### **3.3.2 Verificação da atividade enzimática**

A atividade de endoglicanase foi verificada após a adição de 5 mL de uma solução de vermelho congo  $1 \text{ g L}^{-1}$  sobre cada colônia e incubação das placas à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a solução de corante foi descartada e as placas foram descoradas com uma solução de NaCl 1M por alguns minutos. Após, as placas foram preenchidas com solução de ácido acético 5 % por 30 segundos e finalmente lavadas com solução NaCl + EDTA por 3 horas. A degradação da carboximetilcelulose ao redor da colônia foi caracterizada pela formação de uma área clara e opaca contra uma coloração vermelha para a carboximetilcelulose não degradada. As zonas de hidrólise se estabilizam inundando as colônias com a solução de ácido acético, que muda a cor do meio (celulose – degradada) para azul violáceo (GAMUNDI; STECIOW, 1988).

Para a atividade de xilanase, foi utilizado o método semi-quantitativo estabelecido por Anagnostakis e Hanckin (1975). Para a visualização do halo de degradação, foi utilizado como corante uma solução de Iodo ( $1 \text{ g I}_2$ ;  $5 \text{ g KI}$ ;  $330 \text{ mL}$  água destilada). Após o período de incubação, cobriu-se a superfície das placas com cerca de 10 mL de solução de iodo, aguardando-se cerca de 20 minutos para que ocorresse a reação substrato/solução. Os xilanos não degradados adquirem uma coloração escura, no entanto, a região da hemicelulose degradada, manifesta-se com um halo bem definido, claro e diáfano, ao redor da colônia (GAMUNDI; STECIOW, 1988).

Para avaliar a atividade lignolítica, as placas com os isolados foram inundadas com solução  $\text{FeCl}_3$   $10 \text{ g L}^{-1}$  e  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  numa proporção de 1:1, por 15 minutos ao abrigo de luz. A lignina não degradada fica de uma cor azul-esverdeado; no entanto, a desfenilização do produto se vislumbra como uma região de cor amarelo-verde ao redor e abaixo da colônia (GAMUNDI; STECIOW, 1988).

### **3.3.3 Determinação da atividade enzimática**

As medições dos diâmetros dos halos de hidrólise e da colônia foram realizadas com paquímetro (mm), colocado no reverso das placas de Petri. A atividade enzimática dos microrganismos em cada substrato foi avaliada através do índice de atividade enzimática (I.E.). O I.E. é um parâmetro semi-quantitativo

comumente utilizado para avaliar a produção de enzima por microrganismos em meio sólido (ANAGNOSTAKIS; HANKIN, 1975; LOPES et al., 2011; GOLDBECK et al., 2012).

A atividade enzimática extracelular foi avaliada mediante a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia e expressa como índice enzimático (I.E.) (CESKA, 1971; CHEN et al, 2004;. OLIVEIRA et al, 2006a). Desse modo, quanto maior o índice maior é a atividade enzimática no meio.

Para as avaliações, considerou-se I.E.  $\geq 1,0$  indicativo de alguma alguma produção enzimática em meio sólido (FUNGARO; MACCHERONI, 2002); foram considerados microrganismos produtores de enzimas em meio sólido aqueles com I.E.  $\geq 2,0$  (LEALEM; GASHE 1994; STAMFORD; ARAÚJO; STAMFORD, 1998; OLIVEIRA et al., 2006b; OLIVEIRA et al., 2010).

### **3.4 Extração e amplificação do DNA**

#### **3.4.1 Bactérias**

As bactérias foram cultivadas em 5 mL de meio triptona de soja (TSB, Difco) a  $10 \text{ g L}^{-1}$  a  $35^\circ\text{C}$ , em agitador orbital a 150 rpm por 24 horas. Uma alíquota de 2 mL da suspensão celular foi centrifugada por 2 minutos a  $10.000 \times g$  e o precipitado recolhido. Esta etapa foi realizada duas vezes. Ao material celular foram acrescentados 50  $\mu\text{L}$  de solução de lise (Promega), 80  $\mu\text{L}$  de SDS 10 % e 0,5 g de sílica (0,1 mm). Após homogeneização em agitador tipo *vortex* por 1 minuto, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de fenol à solução e, em seguida, procedeu-se centrifugação por 7 minutos a  $10.000 \times g$ . À fração superior da solução recuperada, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de clorofane (25 fenol: 24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico), seguindo-se de centrifugação por 7 minutos a  $10.000 \times g$ . Novamente, a fração superior da solução foi recuperada, sendo adicionados 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio, seguindo-se de centrifugação por 7 minutos a  $10.000 \times g$ . À fração superior recuperada, foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de isopropanol e 4  $\mu\text{L}$  de solução NaCl 5M procedendo-se incubação a  $4^\circ\text{C}$  por 5 minutos e centrifugação por 7 minutos a  $10.000 \times g$ . Nesta



etapa, ao precipitado recuperado foram adicionados 35 µL de água ultrapurificada e 70 µL de etanol 70 %. Procedeu-se uma centrifugação por 7 minutos a 10.000 x g e após descarte do sobrenadante, uma nova centrifugação por 3 minutos a 10.000 x g. Após secagem a temperatura ambiente, o DNA foi eluído em 70 µL de água ultrapurificada.

As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 1X tampão *High Fidelity PCR Buffer* (Invitrogen) [600 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8.9), 180 mM sulfato de amônio]; 7,0 mM de MgSO<sub>4</sub>; 0,2 mM de cada dideoxinucleotídeo (dNTP); 0,2 mM de cada iniciador PO27F 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (HEUER et al., 1997) e R1387 5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3' (HEUER et al., 1997); 2,5 U taq Platinum (Invitrogen) e 2 µL do DNA de bacteriano.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com desnaturação inicial de 94 °C por 4 minutos e em seguida, 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 62,5 °C por 1 minuto, e extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos de PCR obtidos (~1,4 kb) foram confirmados em gel de agarose 1% e quantificados utilizando o marcador molecular *Low Mass* (Invitrogen), corados em solução brometo de etídio (1 ppm) e fotodocumentados. Os fragmentos obtidos foram purificados utilizando o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA) e sequenciados (Item 3.6).

### 3.4.2 Fungos filamentosos

Para a extração de DNA dos isolados empregou-se procedimento modificado de Sokolovskvy et al. (1990). Os fungos foram isolados em ágar Sabouraud (peptona bacteriológica 5,0 g L<sup>-1</sup>; hidrolisado enzimático de caseína 5,0 g L<sup>-1</sup>; dextrose 40,0 g L<sup>-1</sup>; ágar 15,0 g L<sup>-1</sup>). Após crescimento, o micélio foi triturado em nitrogênio líquido até a obtenção de pó e 20 mg foram resuspendidos em 600 µL de tampão de lise (0,2 M Tris-HCL pH 8,0; 0,25 M NaCL; 0,025 M EDTA; 1 % SDS). Após homogeneização, 600 µL de fenol:clorofórmio (1:1 v/v) foram adicionados procedeu-se a centrifugação por 15 minutos e 12000 rpm. À fração superior recuperada, foram adicionados 500 µL de clorofórmio, seguindo-se de nova centrifugação por 15 minutos e 10.000 x g. À fase aquosa recuperada foi adicionado 1 volume de

isopropanol e 10% do volume de acetato de potássio, procedendo-se homogeneização por inversão e centrifugação por 5 minutos e 12000 rpm. Nessa etapa, o precipitado contendo DNA foi recuperado e lavado com 700 µL de etanol 70% e centrifugado por 8 minutos e 10.000 x g. Após secagem à temperatura ambiente, o DNA foi diluído em 25 µL de solução Tris-HCL 10 mM e armazenado a -80° C.

A região ITS do rDNA foi amplificada por *nested* PCR utilizando-se o DNA extraído e os seguintes iniciadores: primeira reação: EF4 5'-AAGGG[G/A]TGTATTTATTAG-3' (SMIT et al., 1999) e ITS4 5'-CAGGAGACTTGTACACGGTCCCAG-3' (WHITE et al., 1990) e para a segunda reação: ITS1 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAGTAA-3' (WHITE et al., 1990) e ITS2 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3' (WHITE et al., 1990).

As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo 1X tampão *High Fidelity PCR Buffer* (Invitrogen) [600 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8.9), 180 mM sulfato de amônio]; 2,5 mM de MgSO<sub>4</sub>; 0,5 mM de cada dideoxinucleotídeo (dNTP); 0,3 mM de cada iniciador e 2,5 U taq *Platinum* (Invitrogen). As condições de amplificação para a primeira PCR foram: 94°C por 5 minutos, seguidos de 34 ciclos de 94°C por 5 minutos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, com extensão final de 72°C por 5 minutos. Para a segunda PCR: 94°C por 5 minutos, seguidos de 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, com extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR obtidos (~400kb) foram confirmados em gel de agarose 1% e quantificados utilizando o marcador molecular *Low Mass* (Invitrogen), corados em solução brometo de etídio (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) e fotodocumentados. Os fragmentos foram purificados utilizando o kit *Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up Sistem* (PROMEGA, EUA) e sequenciados (Item 3.6).

### 3.4.3 Leveduras

O isolamento do DNA genômico total seguiu a metodologia descrita por Bhadra et al. (2007). As leveduras foram cultivadas em 5 mL de meio YEPD (extrato de levedura 10 g L<sup>-1</sup>; peptona 20 g L<sup>-1</sup>; dextrose 20 g L<sup>-1</sup>; ágar 20 g L<sup>-1</sup> e cloranfenicol

0,05 g L<sup>-1</sup>) a 30 °C, em shaker sob agitação de 150 rpm por 48 horas. Uma alíquota de 2 mL da suspensão celular foi centrifugada por 2 minutos a 11.000 x g e o precipitado recolhido. Esta etapa foi realizada duas vezes. A massa celular foi congelada a -80°C e seguiu para liofilização por 24 horas. O material seco foi triturado com pistilo plástico e ressuspendido em 500 µL de tampão de lise e 50 µL de 2-mercaptanol. Após homogeneização por inversão, foram adicionados 600 µL de solução clorofane (25 fenol: 24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico) à solução e, em seguida, procedeu-se centrifugação por 12 minutos a 8.000 x g. À fração superior da solução recuperada, foram adicionados 600 µL de clorofil (24 clorofórmio: 1 álcool isoamílico), seguindo-se de centrifugação por 12 minutos a 8.000 x g. À fração superior recuperada, foi adicionado 1 volume de etanol absoluto gelado, procedendo-se homogeneização por inversão e centrifugação por 1 minuto a 8.000 x g. Nesta etapa, ao precipitado recuperado foram adicionados 500 µL de etanol 70% gelado. Após secagem a temperatura ambiente, o DNA foi eluído em 100 µL de água ultrapurificada.

As reações foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo: 1X tampão *High Fidelity PCR Buffer* (Invitrogen) [600 mM Tris-SO<sub>4</sub> (pH 8.9), 180 mM sulfato de amônio]; 3,0 mM de MgSO<sub>4</sub>; 0,2 mM de cada dideoxinucleotídeo (dNTP); 0,2 mM de cada iniciador NL1 5'-ATTATCAAGCAGCGGAAGAGAAG-3' (KURTZMAN; ROBNETT, 1997) e NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' (KURTZMAN; ROBNETT, 1997); 1,0 U taq Platinum (Invitrogen) e 1 µL de DNA de levedura. A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em 30 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 45 segundos, e extensão a 72 °C por 1,5 minutos e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos de PCR obtidos (~0,6 kb) foram confirmados em gel de agarose 1% e quantificados utilizando o marcador molecular *Low Mass* (Invitrogen), corados em solução brometo de etídio (1,0 mg mL<sup>-1</sup>) e fotodocumentados. Os fragmentos obtidos foram purificados utilizando o kit *Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EUA) e sequenciados (Item 3.6).

### 3.5 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento de DNA a partir dos produtos de PCR foi realizado pelo Centro de Estudos do Genoma Humano (USP) na plataforma ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems) em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7. Para amplificação do produtos de PCR bacteriano, foi utilizado o iniciador PO27F 5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (HEUER et al., 1997). Para amplificação do produtos de PCR proveniente de fungos filamentosos, foi utilizado o iniciador ITS1 5'-TTTCCGTAGGTGAACCT-3' (WHITE et al., 1990). Para amplificação do produtos de PCR de leveduras, foram utilizados os iniciadores NL1 5'-ATTATCAAGCAGCGGAAGAGAAG-3' (KURTZMAN; ROBNETT, 1997) e NL4 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' (KURTZMAN; ROBNETT, 1997).

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Invitrogen), em um volume final de 10 µL contendo: 2µL de *Ready Reaction Mix*; 1µL de *BigDye Sequencing Buffer*; 1 µL de iniciador a 5µM e produto de PCR na concentração de 25 ng µL<sup>-1</sup> de DNA. As condições de amplificação foram: 96 °C por 1 minuto, seguidos de 25 ciclos de 96 °C por 10 minutos, 50 °C por 5 segundos, 60 °C por 4 minutos. O DNA marcado foi purificado por precipitação conforme descrito no protocolo do *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* e em seguida, encaminhado para o termociclador para a reação de desnaturação. As sequências foram analisadas pelo software *Sequencing Analysis 5.3.1* utilizando o *Base Caller KB*.

### 3.6 Análise das sequências

Apartir dos resultados do sequenciamento obtidos para bactérias e fungos utilizando, respectivamente os iniciadores PO27F e ITS1 foram submetidos a análises comparativas com sequências do banco de dados *GenBank do National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa de alinhamento local do *nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* (ALTSCHUL et. al., 1990), obtendo-se a identificação que apresentou melhores valores de e-value, similaridade.

Para as leveduras, a partir dos resultados do sequenciamento da região D1/D2 do gene 26S rDNA com os iniciadores NL1 e NL4 leveduras e leveduriformes, foram montadas sequências consenso usando o programa BioEdit (HALL, 1999) a partir das sequências obtidas nas direções direta e reversa. Nucleotídeos divergentes ocorrendo na mesma posição foram verificados nos cromatogramas das sequências. As sequências foram submetidas a análises comparativas com sequências do banco de dados *GenBank do National Center for Biotechnology Information* (NCBI) pelo programa de alinhamento local do *nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* (ALTSCHUL et. al., 1990), obtendo-se a identificação que apresentou melhores valores de e-value, similaridade.

### 3.7 Análises filogenéticas

Foram realizadas pesquisas *blastn* locais contra o *nucleotide BLAST* (PRUITT, et al., 2007) no banco de dados usando as seqüências levedura como consultas. A fim de filtrar os resultados de pesquisa BLAST o ponto de corte foi fixado em  $1 \times 10^{-10}$  e a porcentagem de identidade com um valor moderadamente restrito de 40 % para todas as análises. Todos os alinhamentos de sequências foram realizadas utilizando *Muscle* 3,7 (EDGAR, 2004), com todos os parâmetros padrão, seguido de refinamento utilizando o *software CLC BIO Viewer* ([www.clcbio.com](http://www.clcbio.com)). A precisão do alinhamento e da confiabilidade foi avaliada pela metodologia proposta por Hall (2008).

Para a construção da árvore, todos os alinhamentos foram analisados por inferência bayesiana. As análises bayesianas foram realizados na versão paralela do *CVS MrBayes* 3,2 (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001). Cada inferência, foi realizada usando usando-se o método de Monte Carlo - Cadeia de Markov, conjugado ao algoritmo de quatro cadeias de MCMC, constituído por 5.000.000 gerações com amostragem a cada 100 gerações. O desvio padrão médio das frequências fracionadas foi utilizado para avaliar a convergência dos dois ensaios. As probablildades bayesianas posteriores foram calculadas a partir da regra consenso para maioria da árvore amostrada após a período inicial de *burn-in*. Todas as árvores com visualização gráfica de árvores foram feitas usando *MEGA5*.

As análises fenéticas *Neighbor-Joining* (N-J) (SAITOU; NEI 1987) foram aplicadas para obter graficamente a distância fenética dentro dos grupos-alvo e relacionados entre todas as seqüências. O *software* MEGA5 (TAMURA et al. 2011) foi aplicado para a computação da matriz de distâncias (das divergências evolutivas), através da análise do número de diferenças entre as bases por sítio de entre as seqüências. A análise envolveu quatro seqüências de nucleótidos. Todas as posições que continham lacunas e dados faltantes foram eliminados. O conjunto de dados final apresentou um total de 443 posições. A robustez de cada ramo das árvore de N-J foi determinada usando o teste não-paramétricos de *Bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), com 500 repetições.

### **3.8 Avaliação da conversão da xilose em xilitol e etanol**

#### **3.8.1 Ensaio fermentativo**

Os ensaios fermentativos foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Tecnologia de Leveduras (ESALQ /USP). Os isolados de *M. fryan*us e *S. levis*, utilizados nesse ensaio foram ativados em 3 mL de meio líquido YEPX (extrato de levedura 10 g L<sup>-1</sup>; peptona 20 g L<sup>-1</sup>; xilose 20 g L<sup>-1</sup>) e incubados sob agitação a 150 rpm durante 48 horas e temperatura de 30 °C. Após o crescimento, 100 µL de suspensão de cada cultura foram inoculados em 10 mL de meio YEPX novo, e cultivadas em agitador orbital a 150 rpm e 30 °C. Aliquotas foram removidas nos tempos pré-determinados 0, 20, 30 e 40 horas para as dosagens de biomassa consumo de xilose e produções de xilitol e etanol. Os isolados que apresentaram crescimento retardado, foram avaliados em 50 horas, quando toda a xilose foi consumida. A linhagem de *Pichia stipitis* NRRL-Y 7124 foi utilizada como controle da produção de etanol. Para controle da produção de xilitol foi utilizado dado da literatura do mesmo laboratório onde foram feitas estas análises (LOURENÇO, 2009).

### 3.8.2 Métodos analíticos

O crescimento celular foi acompanhado por turbidimetria a 600nm (SENE et al., 2000). Os teores de D-xilose, xilitol e etanol foram determinados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) empregando-se o equipamento CG-480C, municiado de coluna *Aminex* HPX-87H (Bio-Rad) a 60 °C e detector de índice de refração (CG-410). Como fase móvel foi empregado ácido sulfúrico 5 mM a um fluxo de 0,60 mL min<sup>-1</sup>.

### 3.8.3 Fator de conversão de D-xilose em xilitol e (Y/ps) e Produtividade volumétrica de xilitol (Qp)

O fator de conversão, o qual expressa a massa de xilitol produzida por massa de xilose consumida, em gramas, foi calculado pela seguinte equação:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta p}{\Delta s} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad (1)$$

(2) Onde  $P_i$  e  $P_f$  correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g L<sup>-1</sup>) e  $S_i$  e  $S_f$  correspondem as concentrações inicial e final de xilose (g L<sup>-1</sup>).

A produtividade volumétrica de xilitol, a qual expressa a quantidade de xilitol produzida (g L<sup>-1</sup>) por tempo (h) foi calculada de acordo coma seguinte equação:

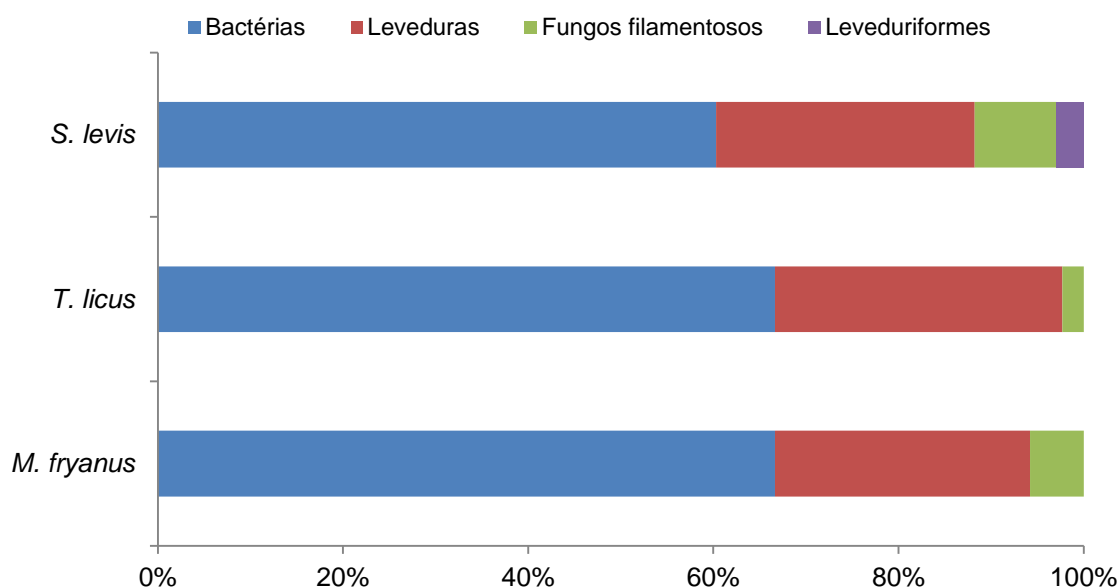
$$Q_p = \frac{\Delta p}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{T_f - T_i} \quad (3)$$

(4) Onde  $P_i$  e  $P_f$  correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g L<sup>-1</sup>) e  $T_i$  e  $T_f$  correspondem aos tempos inicial e final de fermentação.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento

Baseado nas características morfológicas das colônias obtidas, foram isolados um total de 341 morfotipos, sendo 191 bactérias, 127 leveduras, 21 fungos e 2 organismos leveduriformes que foram testados quanto ao seu desempenho na degradação de compostos lignocelulíticos. A maioria dos microrganismos isolados de *M. fryanus*, *S. levis* e *T. licus licus* foram bactérias (> 50 %) seguido por leveduras, sendo as proporções de bactérias, leveduras e fungos filamentosos semelhantes para as três espécies de insetos (Figura 1). Para *D. saccharalis* não foi utilizado o meio TSA para bactérias e desta forma, aproximadamente 90 % dos microrganismos obtidos foram leveduras e 10 % fungos filamentosos.



**Figura 1** – Frequências relativas de microrganismos cultiváveis isolados e testados para degradação de compostos lignocelulósicos



## 4.2 A degradação enzimática de celulose, hemicelulose e lignina

### 4.2.1 Bactérias

Das 191 colônias de bactérias isoladas do trato digestivo das espécies de insetos praga testadas, *M. fryanus* (92 isolados), *S. levis* (41 isolados) e *T. licus licus* (58 isolados), 25 apresentaram atividade enzimática em ao menos um dos substratos acrescidos ao meio como fonte de carbono (celulose e xilano) (Tabela 1 e Tabela 2). *M. fryanus*, *S. levis* e *T. licus licus* apresentaram, respectivamente, 12, 5 e 8 isolados com alguma capacidade de degradação.

O sequenciamento dos isolados que apresentaram atividade enzimática revelou que as bactérias pertencem aos filos Firmicutes e Proteobacteria, sendo que Firmicutes representa 91 %, 80 % e 62,5 % dos isolados sequenciados de *M. fryanus*, *S. levis* e *T. licus licus*, respectivamente. Os isolados de insetos do filo Proteobacteria pertencem todos à Classe Gammaprotobacteria. Em *M. fryanus*, as bactérias que apresentaram alguma degradação pertencem todas ao gênero *Bacillus*. Já em *S. levis* e *T. licus licus*, o gênero *Bacillus* aparece como mais abundante, mas foram identificados representantes dos gêneros *Enterobacter* em *S. levis* e *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* em *T. licus licus*.

Nenhum isolado foi capaz de degradar lignina. Seis isolados apresentaram índices de atividade enzimática muito elevados para a celulose, mais de 20 vezes superior ao halo da colônia, indicando alta síntese de enzima. Esses isolados apresentaram sequência de 16S rRNA semelhantes a *Bacillus* sp., *Bacillus amyloliquefaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae* e *Citrobacter farmeri*. As bactérias que apresentaram maior capacidade de degradação do xilano foram identificadas como próximas a *Bacillus amyloliquefaciens*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter farmeri*. Para xilano, destacaram-se com I.E.  $\geq 2,0$  isolados relacionados a *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus* sp. e *Bacillus amyloliquefaciens*. Dois isolados identificados como próximos a *Bacillus amyloliquefaciens* apresentaram atividade enzimática para celulose e xilano (Tabela 2). A maioria das sequências apresentou alta similaridade ( $\geq 97\%$ ) com espécies

conhecidas. Apenas três sequências apresentaram similaridades  $\leq 94\%$  indicando se não se tratar de gêneros conhecidos.

**Tabela 1** – Identificação por sequências de rDNA 16S de bactérias cultiváveis do mesêntero de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis* e *Telchin licus licus* que apresentaram degradação de substratos lignocelulósicos

Praga	Isolado	Acesso <sup>1</sup>	E-value <sup>2</sup>	ID (%) <sup>3</sup>	Identidade <sup>4</sup>
<b><i>M. fryanus</i></b>	B42	HM998898.1	0.00E+00	98%	<i>Bacillus cereus</i>
	B45	HM998898.1	0.00E+00	96%	<i>Bacillus cereus</i>
	B48	HM566575.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus sp.</i>
	B50	JQ795804.1	0.00E+00	95%	<i>Enterobacter asburiae</i>
	B52	DQ874993.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus sp.</i>
	B55	JQ669397.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus thuringiensis</i>
	B56	AB735995.1	0.00E+00	98%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B86	JQ229690.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus licheniformis</i>
	B102	AB735995.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B135	AB735995.1	0.00E+00	100%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B157	Q340466.1	2.00E-156	92%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B184	JX041917.1	0.00E+00	98%	<i>Bacillus licheniformis</i>
<b><i>S. levis</i></b>	B69	AB735995.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B71	AB735995.1	0.00E+00	98%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B72	EF219421.2	0.00E+00	93%	<i>Enterobacter cloacae</i>
	B74	AB735995.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B75	AB735995.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<b><i>T. licus licus</i></b>	B93	HM063910.1	0.00E+00	99%	<i>Serratia sp.</i>
	B96	AB735995.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B97	AB735995.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B103	AB735995.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B114	CP003026.1	0.00E+00	94%	<i>Enterobacter asburiae</i>
	B115	HE575920.1	0.00E+00	99%	<i>Citrobacter farmeri</i>
	B124	AB735995.1	0.00E+00	96%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
	B176	AB735995.1	0.00E+00	99%	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

<sup>1</sup> Número de acesso da sequência no NCBI. <sup>2</sup> Expectation-value. <sup>3</sup> Valor de identidade entre as sequências obtidas e as de maior similaridade no banco de dados. <sup>4</sup> Táxon definido pelo BLAST NCBI.

**Tabela 2** – Hidrólise in vitro de celulose e xilano por bactérias do trato digestivo de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis* e *Telchin licus licus*

Praga	Isolado	Identidade <sup>1</sup>	IE <sup>2</sup>	
			Celulose	Xilano
<b><i>M. fryanus</i></b>	B42	<i>Bacillus cereus</i>	10,1	-
	B45	<i>Bacillus cereus</i>	-	2,7
	B48	<i>Bacillus sp.</i>	-	3,7
	B50	<i>Enterobacter asburiae</i>	14,0	-
	B52	<i>Bacillus sp.</i>	-	1,9
	B55	<i>Bacillus thuringiensis</i>	7,2	-
	B56	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	11,3	-
	B86	<i>Bacillus licheniformis</i>	1,8	1,3
	B102	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,8	1,4
	B135	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	1,4
	B157	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	1,7
	B184	<i>Bacillus licheniformis</i>	-	1,7
<b><i>S. levis</i></b>	B69	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	35,0	1,9
	B71	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	1,7
	B72	<i>Enterobacter cloacae</i>	25,7	-
	B74	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	10,0	-
	B75	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	28,3	1,4
<b><i>T. licus licus</i></b>	B93	<i>Serratia sp.</i>	1,0	-
	B96	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2,0	1,7
	B97	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,8	-
	B103	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1,7	1,8
	B114	<i>Enterobacter asburiae</i>	15,3	-
	B115	<i>Citrobacter farmeri</i>	27,3	-
	B124	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	25,5	-
	B176	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	1,5

<sup>1</sup>Identidade realizada por BLAST nas sequências de referências do NCBI. <sup>2</sup>Índice de Atividade Enzimática (I.E.) expressa a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia

#### 4.2.2 Fungos filamentosos

Vinte e um isolados de fungos filamentosos proveniente do trato digestivo de *M. fryanus* (8 isolados), *S. levis* (6 isolados), *T. licus licus* (2 isolados) e *D. saccharalis* (5 isolados) foram testados para verificação de atividade em substratos lignocelulósicos. Dentre os fungos filamentosos, todos os isolados pertencem ao filo Ascomycota.

Seis isolados apresentaram alguma degradação para celulose ou xilano e tiveram as sequências analisadas relacionadas aos gêneros *Pyrenophora*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Os 6 isolados de fungos filamentosos apresentaram índice de atividade enzimática I.E.  $\geq 2,0$  para xilano e apenas um isolado apresentou atividade celulolítica (F17). Não foi observado crescimento dos fungos filamentosos no meio com lignina (Tabelas 4 e 5).

**Tabela 3** – Composição das comunidades de fungos filamentosos cultiváveis do mesêntero de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis* identificadas por sequências da região ITS do rDNA

Praga	Isolado	Acesso <sup>1</sup>	E-value <sup>2</sup>	ID (%) <sup>3</sup>	Identidade <sup>4</sup>
<i>M. fryanus</i>	F3	NW_002196671.1	5.00E-52	83%	<i>Penicillium marneffeii</i>
<i>S. levis</i>	F12	NC_007197.1	2.00E-30	87%	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	F21	NW_003521702.1	5.00E-27	78%	<i>Pyrenophora teres f. teres</i>
<i>T. licus licus</i>	F13	NW_003521702.1	2.00E-27	78%	<i>Pyrenophora teres f. teres</i>
<i>D. saccharalis</i>	F17	NW_003521702.1	1.00E-32	78%	<i>Pyrenophora teres f. teres</i>
	F18	NC_007197.1	2.00E-30	87%	<i>Aspergillus fumigatus</i>

<sup>1</sup> Número de acesso da sequência no NCBI. <sup>2</sup> Expectation-value. <sup>3</sup> Valor de identidade entre as sequências obtidas e as de maior similaridade no banco de dados. <sup>4</sup> Táxon definido pelo BLAST NCBI.

**Tabela 4** – Hidrólise in vitro de celulose e xilano por fungos filamentosos do trato digestivo de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis*

Praga	Isolado	Identidade <sup>1</sup>	IE <sup>2</sup>	
			Celulose	Xilano
<i>M. fryanus</i>	F3	<i>Penicillium marneffeii</i>	-	2,1
<i>S. levis</i>	F12	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	2,3
	F21	<i>Pyrenophora teres f. teres</i>	-	2,4
<i>T. licus licus</i>	F13	<i>Pyrenophora teres f. teres</i>	-	3,0
<i>D. saccharalis</i>	F17	<i>Pyrenophora teres f. teres</i>	1,6	-
	F18	<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	2,6

<sup>1</sup> Identidade realizada por BLAST nas sequências de referências do NCBI. <sup>2</sup> Índice de Atividade Enzimática (I.E.) expressa a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

### 4.2.3 Leveduras e organismos leveduriformes

Um total de 128 isolados entre leveduras e organismos leveduriformes isolados do mesêntero de *M. fryanus* (38 isolados), *S. levis* (21 isolados), *T. licus* (27 isolados) e *D. saccharalis* (42 isolados) foram testados para degradação lignocelulítica.

Os isolados foram relacionados a nove gêneros: *Meyerozyma*, *Candida*, *Scheffersomyces*, *Pichia*, *Aureobasidium*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Tremellae* e *Prototheca* (Figura 3). Dentre leveduras, apenas 6 % dos isolados pertencem ao filo Basidiomycota, sendo o restante pertencente ao filo Ascomycota. Os dois organismos leveduriformes, isolados de *S. levis*, pertencem à divisão Charophyta família Chlorellaceae.

Com relação às leveduras cultiváveis, os microrganismos relacionaram-se majoritariamente aos gêneros *Meyerozyma* e *Candida*, que correspondem a, respectivamente, 43,3 %, e 38,6 % de todos os isolados (Figura 2). Sequências relacionadas à *Candida intermedia* foram encontradas em todas as espécies de insetos testadas. A análise das sequências evidenciou um maior número de espécies de leveduras cultiváveis no mesêntero de *D. saccharalis* em comparação aos outros insetos.

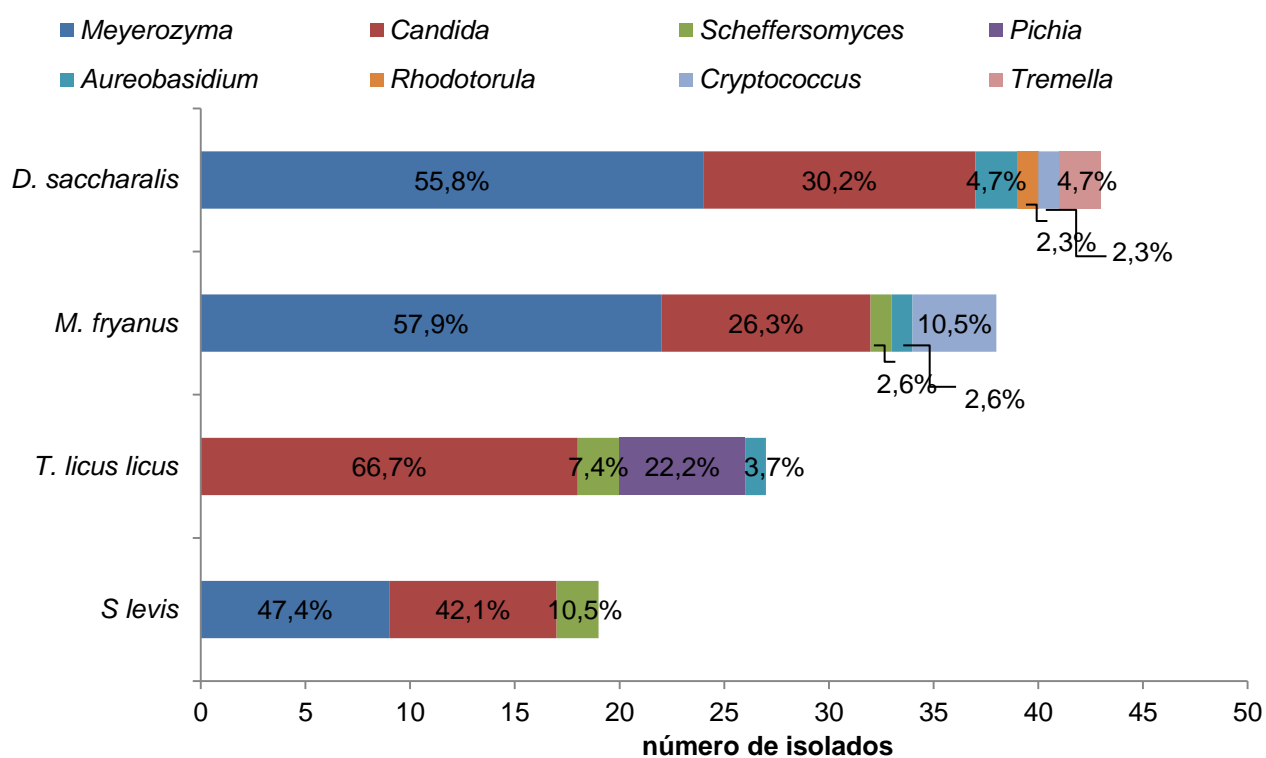
Verificou-se 39 isolados com alguma produção enzimática em meio sólido: 19 isolados de *M. fryanus*; 7 isolados de *S. levis*; 7 isolados de *T. licus* e 6 isolados de *D. saccharalis*. Em *M. fryanus* encontrou-se o maior número de isolados com produção enzimática sobre os substratos (Figura 3).

Para o meio de celulose, dentre as 22 leveduras que apresentaram halos em meio sólido, três tiveram índices de atividade enzimática (I.E.) maiores que 2,0. No meio de xilano, 23 isolados apresentaram halos de degradação e oito deles tiveram I.E.  $\geq$  2,0. Dois isolados, L7 e L107, apresentaram atividade enzimática para celulose e xilano. Os isolados que apresentaram resultados relevantes nos meios testados foram relacionados às espécies *Meriozyma guilliermondii*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida pseudointermedia*, *Candida parapsilosis*, *Candida solani* e *Aureobasidium pullulans* (Tabela 6).

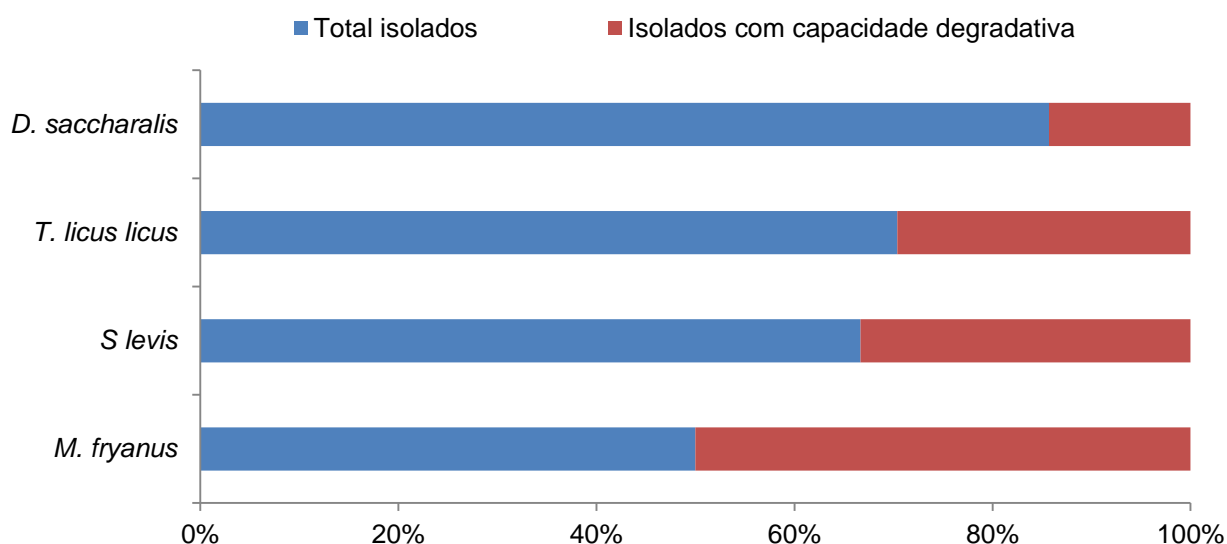
Em *D. saccharalis*, foram observadas diferenças na degradação das fontes de carbono entre aqueles isolados de insetos de campo e de criação de laboratório,

cujas sequências foram relacionadas a *Meyerozyma guilliermondii*. Os isolados provenientes da criação em laboratório, recuperados do tubo digestivo (L133) em regurgitado (L134) e excremento (L135) não apresentaram degradação da celulose, característica que foi exclusiva do isolado coletado de inseto proveniente de campo (L125).

Os organismos leveduriformes não apresentaram atividade enzimática expressiva nos compostos testados.



**Figura 2** – Frequências relativas dos gêneros identificados por sequenciamento das leveduras cultiváveis encontradas nos insetos



**Figura 3** – Relação entre total de leveduras isoladas e aquelas que apresentaram degradação positiva para compostos lignocelulósicos

**Tabela 5** – Leveduras cultiváveis do mesêntero de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis* identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA

continua

Praga	Isolado	Acesso <sup>1</sup>	E-value <sup>2</sup>	ID (%) <sup>3</sup>	Identidade <sup>4</sup>
<i>M. fryanus</i>	L1	JQ398673.1	0.00E+00	91%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L2	FJ986609.1	0.00E+00	100%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L3	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L4	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L5	FJ475226.1	0.00E+00	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L6	FN428921.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L7	FJ986609.1	0.00E+00	98%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	L8	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L9	JQ398673.1	0.00E+00	92%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L10	FJ986609.1	0.00E+00	92%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L11	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L12	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L13	FJ986609.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L14	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L15	HM988720.1	0.00E+00	98%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L16	FJ986609.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L17	FJ986609.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L18	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L19	JQ398673.1	0.00E+00	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L20	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L21	FN428921.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L22	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>

**Tabela 5** – Leveduras cultiváveis do mesêntero de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis* identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA

continuação					
Praga	Isolado	Acesso <sup>1</sup>	E-value <sup>2</sup>	ID (%) <sup>3</sup>	Identidade <sup>4</sup>
<b><i>M. fryanus</i></b>	L23	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L24	FJ986609.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L25	FJ986609.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L26	JQ678690.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L27	FN428921.1	0.00E+00	98%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L78	FN428921.1	0.00E+00	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	L79	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Cryptococcus laurentii</i>
	L80	FJ432595.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L81	GU373754.1	0.00E+00	96%	<i>Scheffersomyces spartinae</i>
	L82	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L83	GU373754.1	0.00E+00	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L84	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L85	AB617937.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L87	JQ398673.1	0.00E+00	97%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	L88	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L_	JQ678690.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
<b><i>S. levis</i></b>	L28	JQ678690.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L29	JQ678690.1	0.00E+00	93%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L30	JQ678690.1	0.00E+00	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L31	JQ678690.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L32	FJ432595.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L33	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Scheffersomyces spartinae</i>
	L34	JQ689045.1	0.00E+00	100%	<i>Candida intermedia</i>
	L35	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Scheffersomyces spartinae</i>
	L36	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L37	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L38	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L40	AB281307.1	0.00E+00	100%	<i>Candida intermedia</i>
	L41	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L43	AB617984.1	0.00E+00	97%	<i>Candida intermedia</i>
	L44	AB281307.1	7.00E-161	99%	<i>Candida sorboxylosa</i>
	L45	-	-	-	Não identificado
	L46	AB617984.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
<b><i>T. licus licus</i></b>	L47	HM191674.1	2.00E-156	97%	<i>Candida sorboxylosa</i>
	L48	DQ466529.1	1.00E-16	92%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L49	AB281307.1	6.00E-167	98%	<i>Candida sorboxylosa</i>
	L50	AF530614.1	0.00E+00	98%	<i>Candida intermedia</i>
	L51	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Pichia sp.</i>
	L52	AF530614.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L53	FJ432595.1	0.00E+00	99%	<i>Pichia sp.</i>
	L54	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Scheffersomyces spartinae</i>
	L55	EF550336.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L56	AF530614.1	0.00E+00	99%	<i>Candida solani</i>
	L57	AF530614.1	0.00E+00	99%	<i>Pichia sp.</i>
	L58	AF530614.1	0.00E+00	99%	<i>Pichia sp.</i>
	L59	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Pichia sp.</i>
	L60	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L61	JN031578.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L62	HE605209.1	0.00E+00	99%	<i>Candida tropicalis</i>



**Tabela 5** – Leveduras cultiváveis do mesêntero de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis* identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA

continuação					
Praga	Isolado	Acesso <sup>1</sup>	E-value <sup>2</sup>	ID (%) <sup>3</sup>	Identidade <sup>4</sup>
<i>T. licus licus</i>	L63	AB281307.1	0.00E+00	93%	<i>Candida parapsilosis</i>
	L64	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L65	HE605209.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L66	AB281307.1	0.00E+00	93%	<i>Candida parapsilosis</i>
	L68	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L69	JN544014.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L70	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Candida solani</i>
	L71	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L72	AB281307.1	0.00E+00	100%	<i>Candida intermedia</i>
	L74	AB281307.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L75	AF530614.1	0.00E+00	99%	<i>Candida intermedia</i>
	L76	FJ468448.1	0.00E+00	99%	<i>Pichia</i> sp.
	L89	EU598220.1	0.00E+00	93%	<i>Scheffersomyces spartinae</i>
	L90	FN428936.1	0.00E+00	99%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>D. saccharalis</i>	L91	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Tremella</i> aff. <i>Globispora</i>
	L92	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L93	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L94	FN428936.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L95	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Tremella</i> aff. <i>globispora</i>
	L96	JQ965868.1	0.00E+00	96%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L97	JQ398673.1	0.00E+00	96%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L98	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L99	FJ986609.1	0.00E+00	91%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L100	JQ398673.1	0.00E+00	98%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L101	FJ986609.1	0.00E+00	97%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L102	FJ986609.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L103	AB281307.1	5.00E-175	87%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L104	GU373782.1	0.00E+00	94%	<i>Candida intermedia</i>
	L105	EF643571.1	0.00E+00	99%	<i>Candida tropicalis</i>
	L106	JQ814786.1	0.00E+00	99%	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>
	L107	JQ398673.1	0.00E+00	99%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	L108	HM988720.1	8.00E-133	82%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L109	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L111	GU373754.1	0.00E+00	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L112	FJ986609.1	0.00E+00	98%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L113	FJ986609.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L114	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L115	GU373782.1	0.00E+00	98%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L116	FJ483892.1	0.00E+00	99%	<i>Candida tropicalis</i>
	L117	GU373754.1	4.00E-66	77%	<i>Candida tropicalis</i>
	L118	FJ986609.1	0.00E+00	97%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L119	EU598220.1	0.00E+00	99%	<i>Candida pseudointermedia</i>
	L120	GU373754.1	0.00E+00	96%	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	L121	GU373754.1	0.00E+00	99%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L122	GU373754.1	0.00E+00	100%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L123	JQ398673.1	0.00E+00	98%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L124	JQ398673.1	0.00E+00	90%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>

**Tabela 5** – Leveduras cultiváveis do mesêntero de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis* identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA

conclusão					
Praga	Isolado	Acesso <sup>1</sup>	E-value <sup>2</sup>	ID (%) <sup>3</sup>	Identidade <sup>4</sup>
<b><i>D. saccharalis</i></b>	L125	JN181254.1	0.00E+00	92%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L127	JQ180256.1	0.00E+00	98%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L128	FN428866.1	0.00E+00	100%	<i>Candida</i> sp.
	L129	AB499000.1	0.00E+00	95%	<i>Cryptococcus flavescens</i>
	L130	AB499000.1	0.00E+00	95%	<i>Candida intermedia</i>
	L131	JQ398673.1	0.00E+00	95%	<i>Candida akabanensis</i>
	L133	JQ965868.1	0.00E+00	98%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L134	JQ965868.1	0.00E+00	96%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
	L135	JQ965868.1	0.00E+00	95%	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>

<sup>1</sup> Número de acesso da sequência no NCBI. <sup>2</sup> Expectation-value. <sup>3</sup> Valor de identidade entre as sequências obtidas e as de maior similaridade no banco de dados. <sup>4</sup> Táxon definido pelo BLAST NCBI.

**Tabela 6** – Hidrólise *in vitro* de celulose e xilano por leveduras do trato digestivo de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis*

continua				
Praga	Isolado	Identidade <sup>1</sup>	IE <sup>2</sup>	
			Celulose	Xilano
<b><i>M. fryanus</i></b>	L3	<i>Candida intermedia</i>	1,4	-
	L4	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,0	3,0
	L5	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,1	-
	L7	<i>Cryptococcus laurentii</i>	3,0	3,1
	L9	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	2,3
	L11	<i>Candida pseudointermedia</i>	-	2,0
	L13	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,2	-
	L14	<i>Candida pseudointermedia</i>	1,2	-
	L15	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,4	-
	L17	<i>Candida pseudointermedia</i>	1,1	-
	L20	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,2	3,2
	L22	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	3,6
	L24	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,3	-
	L25	<i>Candida pseudointermedia</i>	1,0	-
	L26	<i>Candida pseudointermedia</i>	1,7	-
	L78	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	3,0
	L79	<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	3,2
	L81	<i>Scheffersomyces spartinae</i>	-	1,1
	L88	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	1,2
<b><i>S. levis</i></b>	L31	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,6	-
	L36	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,4	1,5
	L37	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,3	2,2
	L38	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1,4	1,9
	L45	Não identificado	-	1,8
	L46	<i>Candida intermedia</i>	-	1,7
	L48	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	1,6
	L56	<i>Candida solani</i>	-	1,5

**Tabela 6** – Hidrólise in vitro de celulose e xilano por leveduras do trato digestivo de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis*

Praga	Isolado	Identidade <sup>1</sup>	conclusão IE <sup>2</sup>	
			Celulose	Xilano
<b><i>T. licus licus</i></b>	L63	<i>Candida parapsilosis</i>	-	1,6
	L70	<i>Candida solani</i>	-	2,2
	L71	<i>Candida intermedia</i>	1,4	0,3
	L74	<i>Candida intermedia</i>	-	1,6
	L76	<i>Pichia sp.</i>	-	1,4
	L107	<i>Aureobasidium pullulans</i>	3,3	2,3
<b><i>D. saccharalis</i></b>	L117	<i>Candida tropicalis</i>	1,9	1,8
	L120	<i>Aureobasidium pullulans</i>	1,8	1,8
	L125	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	2,5	1,8
	L133	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	1,6
	L134	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	2,6
	L135	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	3,0

<sup>1</sup>Identidade realizada por BLAST nas sequências de referências do NCBI. <sup>2</sup>Índice de Atividade Enzimática (I.E.) expressa a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

**Tabela 7** – Identidade dos organismos leveduriformes cultiváveis isolados de *Sphenophorus levis* identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA

Praga	Isolado	Acesso <sup>1</sup>	E-value <sup>2</sup>	ID (%) <sup>3</sup>	Identidade <sup>4</sup>
<b><i>S. levis</i></b>	L39	<a href="#">AB097095.1</a>	0.00E+00	93%	<i>Prototheca zopfii</i> var. <i>hydrocarborea</i>
	L77	<a href="#">AB097095.1</a>	0.00E+00	99%	<i>Prototheca zopfii</i> var. <i>hydrocarborea</i>

<sup>1</sup> Número de acesso da sequência no NCBI. <sup>2</sup> Expectation-value. <sup>3</sup> Valor de identidade entre as sequências obtidas e as de maior similaridade no banco de dados. <sup>4</sup> Táxon definido pelo BLAST NCBI.

**Tabela 8** – Hidrólise in vitro de celulose e xilano por organismos leveduriformes do trato digestivo de *Sphenophorus levis*

Praga	Isolado	Identidade	IE <sup>2</sup>	
			Celulose	Xilano
<b><i>S. levis</i></b>	L39	<i>Prototheca zopfii</i> var. <i>hydrocarborea</i>	1,3	1,5
	L77	<i>Prototheca zopfii</i> var. <i>hydrocarborea</i>	-	1,9

<sup>1</sup>Identidade realizada por BLAST nas sequências de referências do NCBI. <sup>2</sup>Índice de Atividade Enzimática (I.E.) expressa a relação entre o diâmetro médio do halo de degradação e o diâmetro médio da colônia.

### 4.3 Análise filogenética das leveduras e organismos leveduriformes

A verificação das relações entre as leveduras e microrganismos leveduriformes isolados dos insetos foi realizada através da árvore consenso criada por inferência bayesiana com as sequências do *BLASTn* de maior similaridade (Figura 4). De forma geral, as sequências dos isolados que foram relacionadas a uma determinada espécie por *BLAST* ficaram agrupadas, corroborando com sua identidade e separação taxonômica em relação a outros grupos. Entre os isolados, 11 apresentam sequência idêntica com as sequências referência utilizadas; 87 mostraram até 1 % de diferença com sequências referência utilizadas; 25 isolados apresentaram entre 2-10 % de diferença e 4 isolados apresentaram entre 11 e 23 % de diferença com sequências referência utilizadas (Tabela 5).

Em seguida, a distribuição do caráter de degradação entre os isolados foi estudada em uma árvore consenso criada por análise bayesiana das sequências de leveduras e organismos leveduriformes isolados dos insetos praga. A degradação tanto da celulose quanto do xilano aparecem como caracteres distribuídos entre os microrganismos isolados nas espécies de insetos testadas. É nítida a predominância de isolados de *M. fryanusi* com atividade enzimática em meio de xilano.

Através do *software* MEGA 5,0 (TAMURA et al., 2011) foi calculada a distância evolutiva sobre pares de sequências entre grupos (dentro das espécies pré-estabelecidas pelo *BLASTn*) com a finalidade de verificar a divergência entre esses grupos nos insetos estudados. De forma geral, as distâncias entre as sequências nos grupos variaram de 0 % a 20,1 %. (APÊNDICE A).

Uma vez que utilização do 26S rDNA na identificação rápida de espécies considera sequências que diferem em cerca de 1 % como espécies diferentes (KURTZMAN; ROBNETT, 1998), foi estabelecido o corte em 1 % de divergência para estimar o número de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) dentro de cada grupo; resultados de divergência > 1 % foram indicativos de UTOs distintas (Tabela 9).

Dessa forma, entre isolados relacionados a *M. guilliermondii* dentro de *M. fryanusi*, foi verificada a existência de 4 grupos diferentes (4 UTOs). No geral, os resultados em UTOs foram maiores quando os isolados de um mesmo grupo foram relacionados entre espécies pragas diferentes (Tabela 10).

**Tabela 9** - Unidades taxonômicas operacionais (UTOs)\* para táxons definidos em *Diatraea saccharalis*, *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis* e *Telchin licus licus*

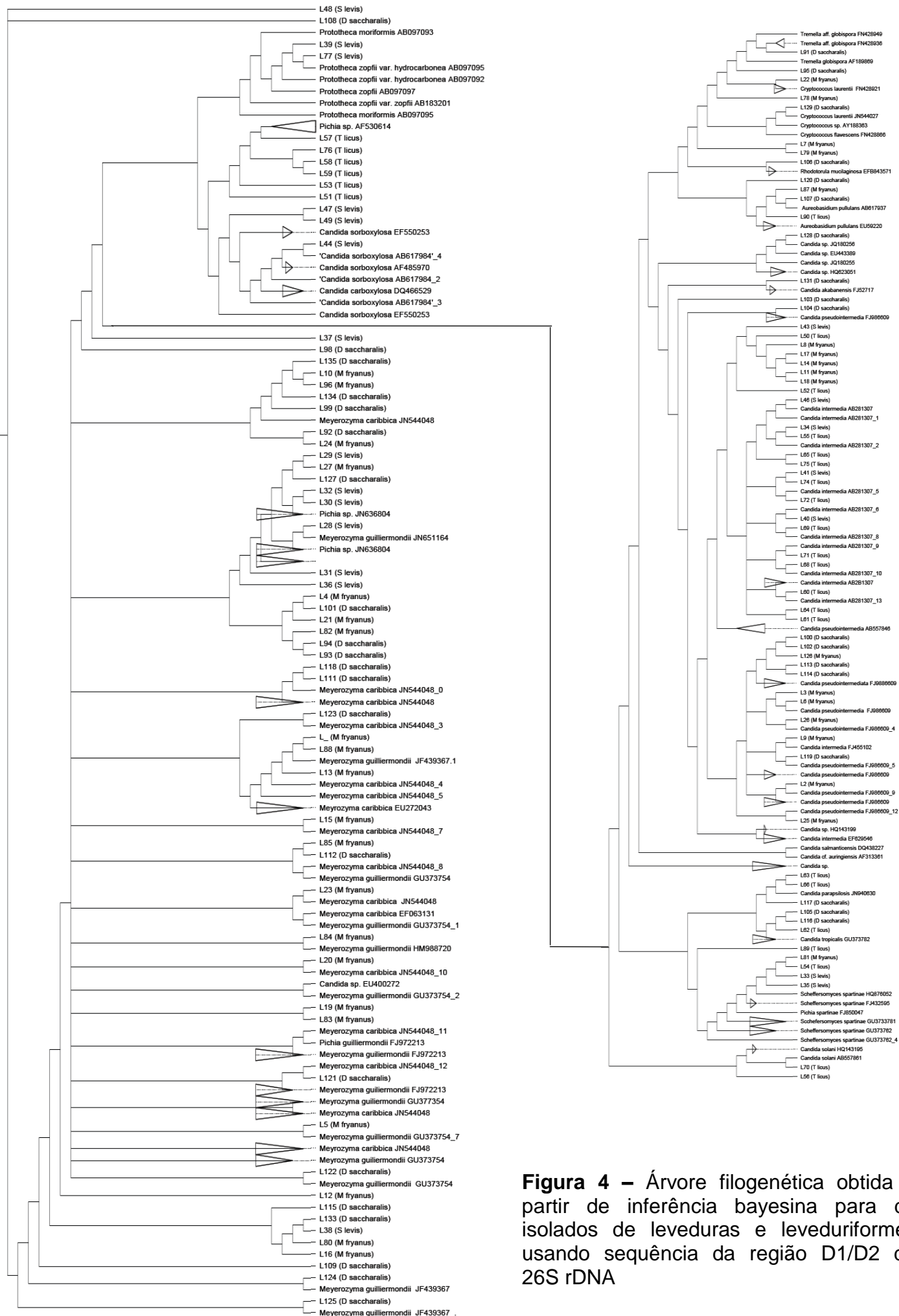
	<i>Diatraea saccharalis</i>	<i>Migdolus fryanus</i>	<i>Sphenophorus levis</i>	<i>Telchin licus licus</i>
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	9	4	3	-
<i>Candida intermedia</i>	2	1	1	1
<i>Candida pseudointermedia</i>	3	1	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	2	-	-	1
<i>Candida sorboxylosa</i>	-	-	3	-
<i>Candida solani</i>	-	-	-	2
<i>Candida akabanensis</i>	1	-	-	-
<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	-	1
<i>Candida sp.</i>	1	-	-	-
<i>Scheffersomyces spartinae</i>	-	1	1	2
<i>Pichia sp.</i>	-	-	-	1
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	1	-	1
<i>Cryptococcus laurentii</i>	-	2	-	-
<i>Cryptococcus flavescens</i>	1	-	-	-
<i>Tremella aff. globispora</i>	1	-	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	-	-	-

\*Porcentagem de similaridade < 99 % foi indicativa de UTOs distintas.

**Tabela 10** – Unidades taxonômicas operacionais (UTOs)\* definidas nas comparações entre sequências realizadas com isolados de *Diatraea saccharalis*, *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis* e *Telchin licus licus*

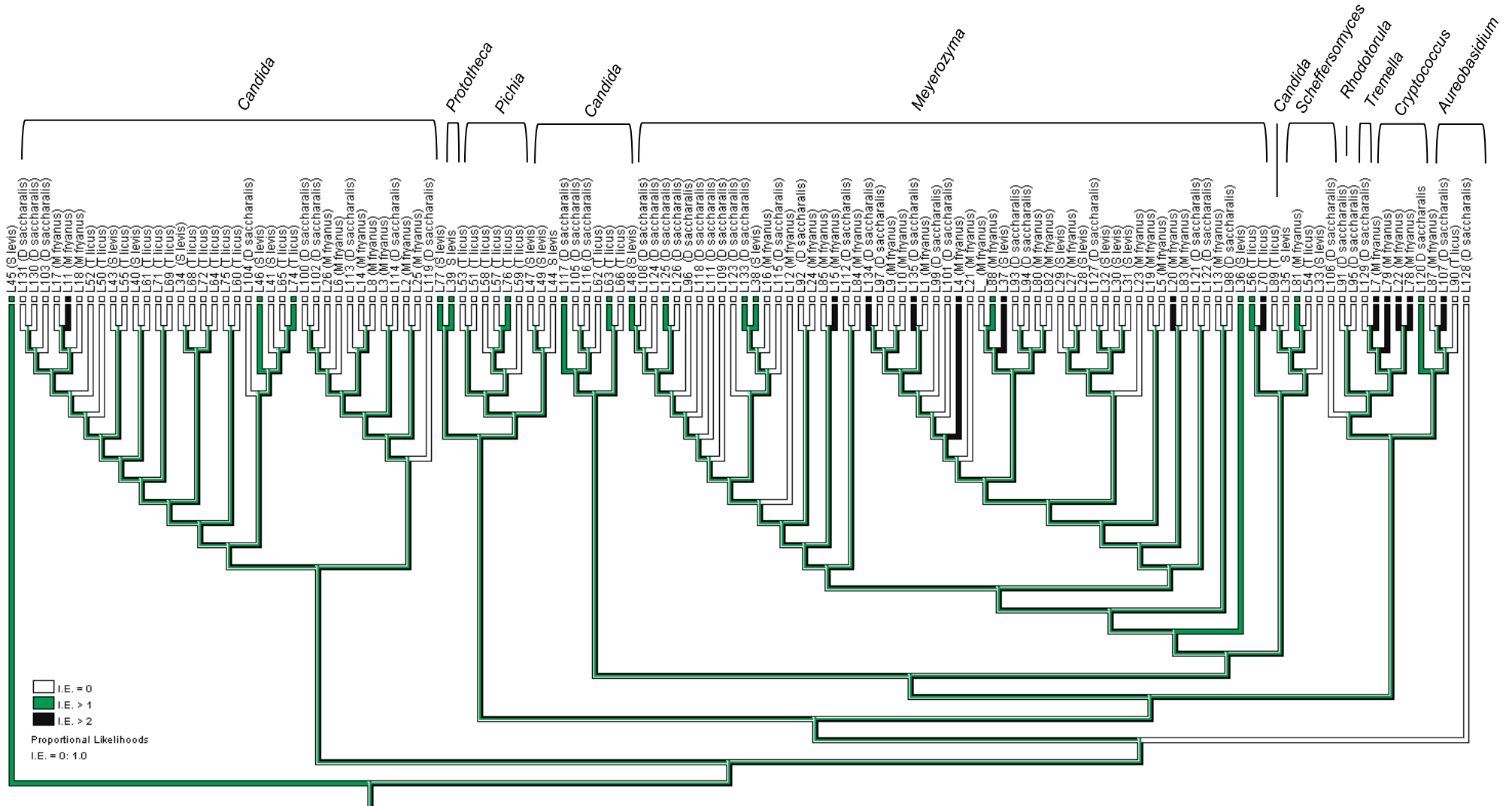
	<i>D. saccharalis</i> X <i>T. licus licus</i>	<i>M. fryanus</i> X <i>T. licus licus</i>	<i>M. fryanus</i> X <i>D. saccharalis</i>	<i>M. fryanus</i> X <i>S. levis</i>	<i>S. levis</i> X <i>T. licus licus</i>	<i>S. levis</i> X <i>D. saccharalis</i>
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	-	-	12	6	-	11
<i>Candida intermedia</i>	3	1	3	1	1	3
<i>Candida pseudointermedia</i>	-	-	3	-	-	-
<i>Candida tropicalis</i>	2	-	-	-	-	-
<i>Scheffersomyces spartinae</i>	-	3	-	2	2	-
<i>Aureobasidium pullulans</i>	1	2	2	-	-	-

\*Porcentagem de similaridade < 99 % foi indicativa de UTOs distintas.



**Figura 4** – Árvore filogenética obtida a partir de inferência bayesina para de isolados de leveduras e leveduriformes usando sequência da região D1/D2 do 26S rDNA

**Figura 5** – Degradação de celulose em leveduras e microrganismos leveduriformes isolados de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis* identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA



**Figura 6** – Degradação de xilano em leveduras e leveduriformes isolados de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus* e *Diatraea saccharalis* identificadas por sequências da região D1/D2 do 26S rDNA



#### 4.4 Ensaio de conversão de xilose em xilitol ou etanol por leveduras e organismos leveduriformes

Nos ensaios realizados, não foi detectada a conversão da D-xilose em etanol para os isolados testados exceto no controle, a *Pichia* NRRL-Y, que apresentou produção máxima de  $6,62 \text{ g L}^{-1}$  etanol após 30 horas de ensaio (Figura 8).

Dos 21 isolados testados, 15 consumiram 100 % da D-xilose em 30 horas de fermentação. As outras seis linhagens mostraram-se menos eficientes na utilização do substrato, não tendo consumido toda a xilose mesmo após 40 horas de fermentação (Figuras 8 a 10). Os piores desempenhos foram dos isolados L31 e L45 que consumiram, respectivamente, 81 % e 79 % da D- xilose em 40 horas de fermentação.

Para os isolados de crescimento retardado, a dosagem da D-xilose realizada após 50 horas evidenciou esgotamento desse substrato. No entanto, a concentração de xilitol também apresentou queda.

O rendimento de xilitol variou de um mínimo de  $0,99 \text{ g L}^{-1}$  no isolado L7 (Figura 8), a um máximo de  $11,12 \text{ g L}^{-1}$  no isolado L39 (Figura 10). O isolado L39 apresentou produção máxima de xilitol ( $Y_{p/s}$ ) de  $0,51 \text{ g g}^{-1}$  xilose e produtividade volumétrica ( $Q_p$ ) de  $0,26 \text{ g}_{\text{xilitol}} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , parâmetros que evidenciam a velocidade com que o isolado converte açúcar no produto de interesse (Tabela 9). De fato, após 30 horas de fermentação, 100 % da D-xilose já havia sido consumida (Figura 8). A pequena diminuição na concentração de xilitol no tempo 40 horas pode ser devido ao fato de o xilitol ter sido consumido pelo isolado para produção de outros metabólitos (LOURENÇO, 2009).

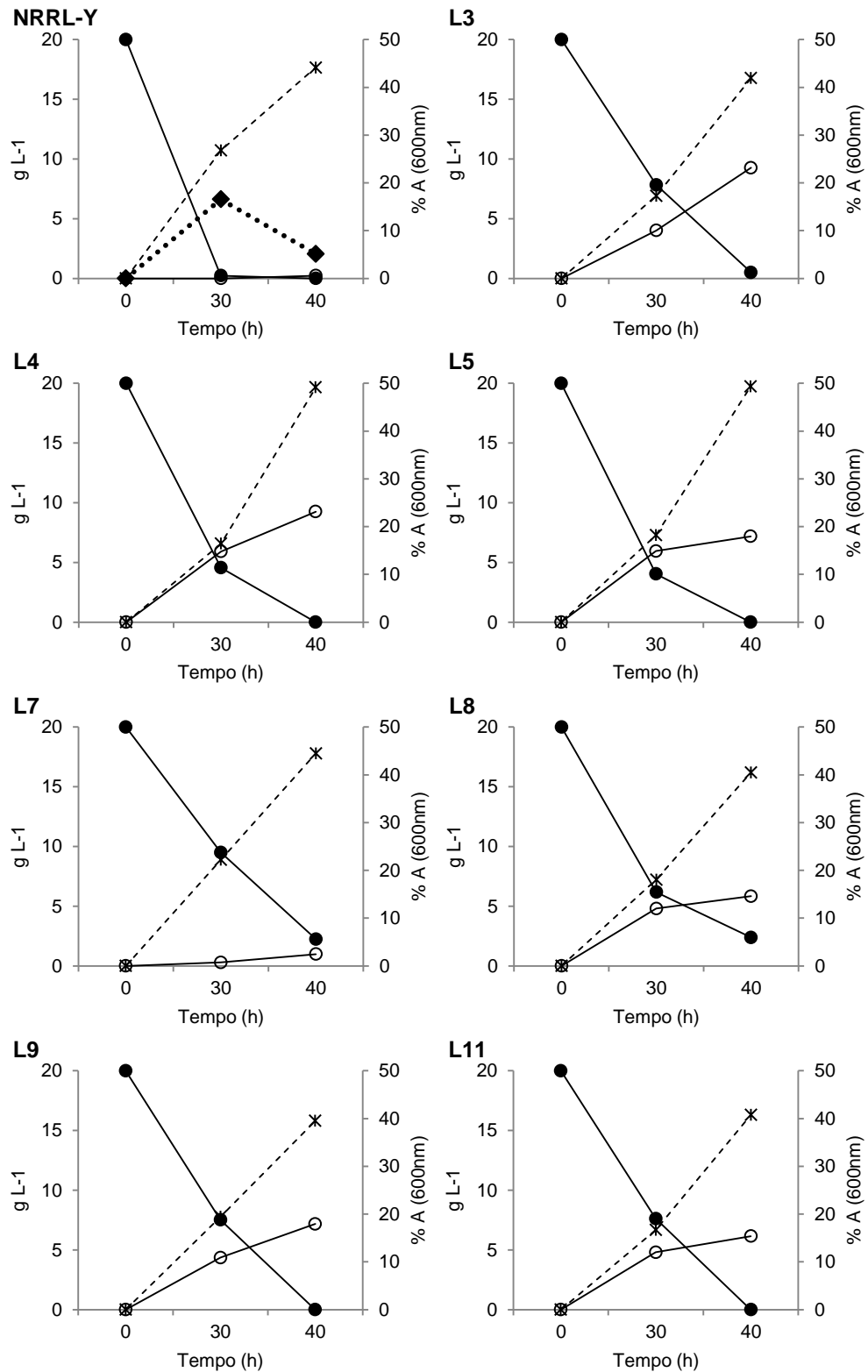
A levedura L7 apresentou o menor rendimento em xilitol, apresentando uma produção máxima de  $0,99 \text{ g L}^{-1}$  no tempo de 40 horas e onde a D-xilose ainda não havia sido totalmente consumida (Figura 8). Apesar desse fato, o isolado apresentou consumo de xilose e crescimento celular durante o ensaio. Resultados parecidos foram verificados para os isolados L31 e L45.

Os isolados L3, L5, L8, L17, L20 e L31, que não apresentaram atividade enzimática para o xilano ((Tabela 6) apresentaram consumo da xilose presente no meio líquido YEPX utilizado (Figuras 8 a 10).

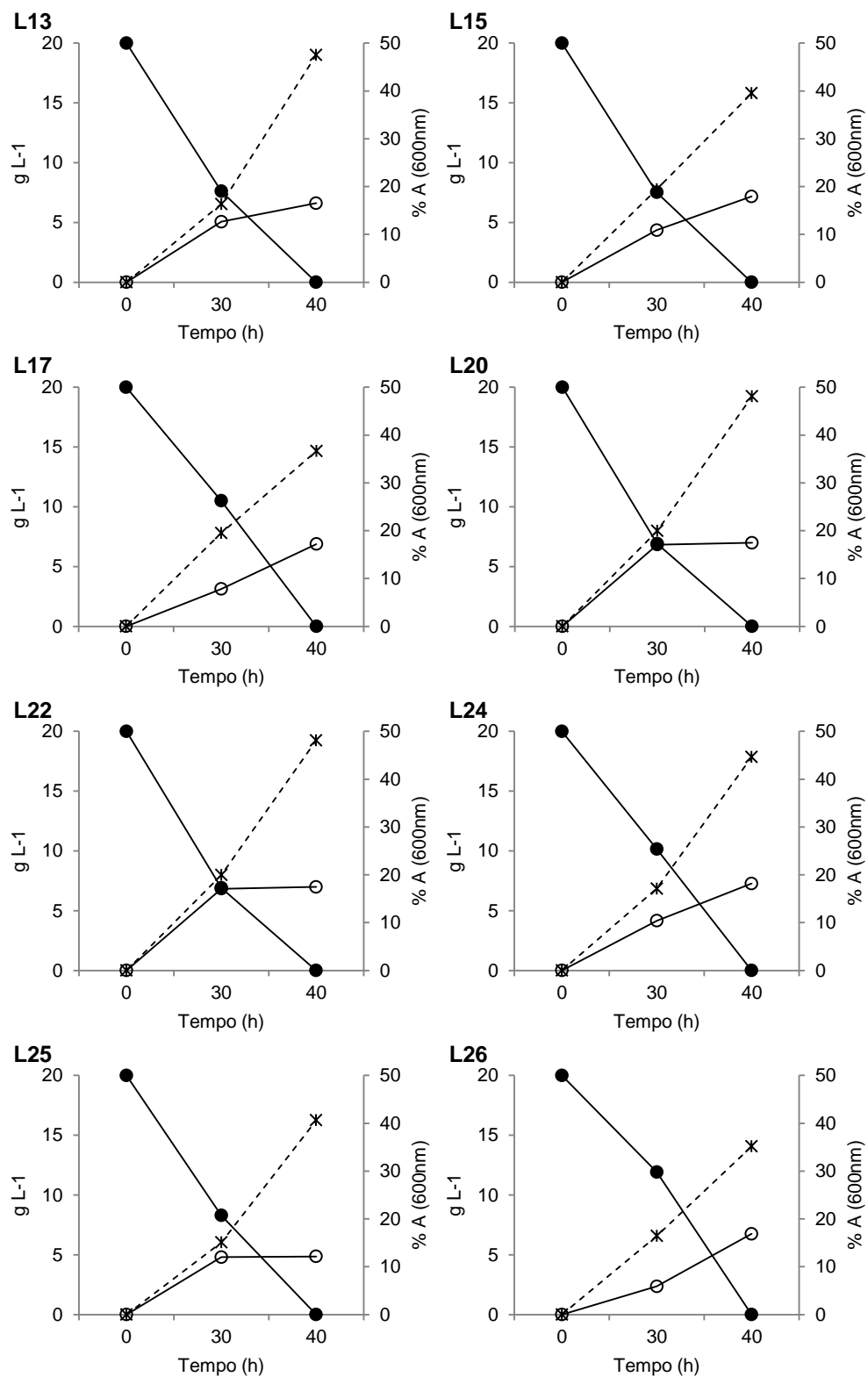
**Tabela 11** – Produção de xilitol por grama de xilose e produtividade volumétrica das leveduras testadas para produção de xilitol

Isolado	Acesso <sup>1</sup>	Identidade <sup>2</sup>	Produção de xilitol (g <sup>-1</sup> xilose)	Produtividade volumétrica (g <sub>xilitol</sub> L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
L3	JQ398673.1	<i>Candida intermedia</i>	0,48	0,23
L4	JQ398673.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,46	0,23
L5	FJ475226.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,36	0,18
L7	FJ986609.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,06	0,02
L8	JQ398673.1	<i>Candida pseudointermedia</i>	0,33	0,15
L9	JQ398673.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,36	0,18
L11	GU373754.1	<i>Candida pseudointermedia</i>	0,31	0,15
L13	FJ986609.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,33	0,17
L15	HM988720.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,43	0,22
L17	FJ986609.1	<i>Candida pseudointermedia</i>	0,34	0,17
L20	GU373754.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,35	0,17
L22	JQ398673.1	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,25	0,12
L24	FJ986609.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,36	0,18
L25	FJ986609.1	<i>Candida pseudointermedia</i>	0,24	0,12
L26	JQ678690.1	<i>Candida pseudointermedia</i>	0,34	0,17
L31	JQ678690.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,11	0,04
L36	JQ398673.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,33	0,16
L37	JQ398673.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,34	0,17
L38	AB281307.1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	0,34	0,17
L39	<u>AB097095.1</u>	<i>Prototheca zopfii</i> var. <i>hydrocarborea</i>	0,51	0,26
L45	-	Não identificado	0,15	0,06

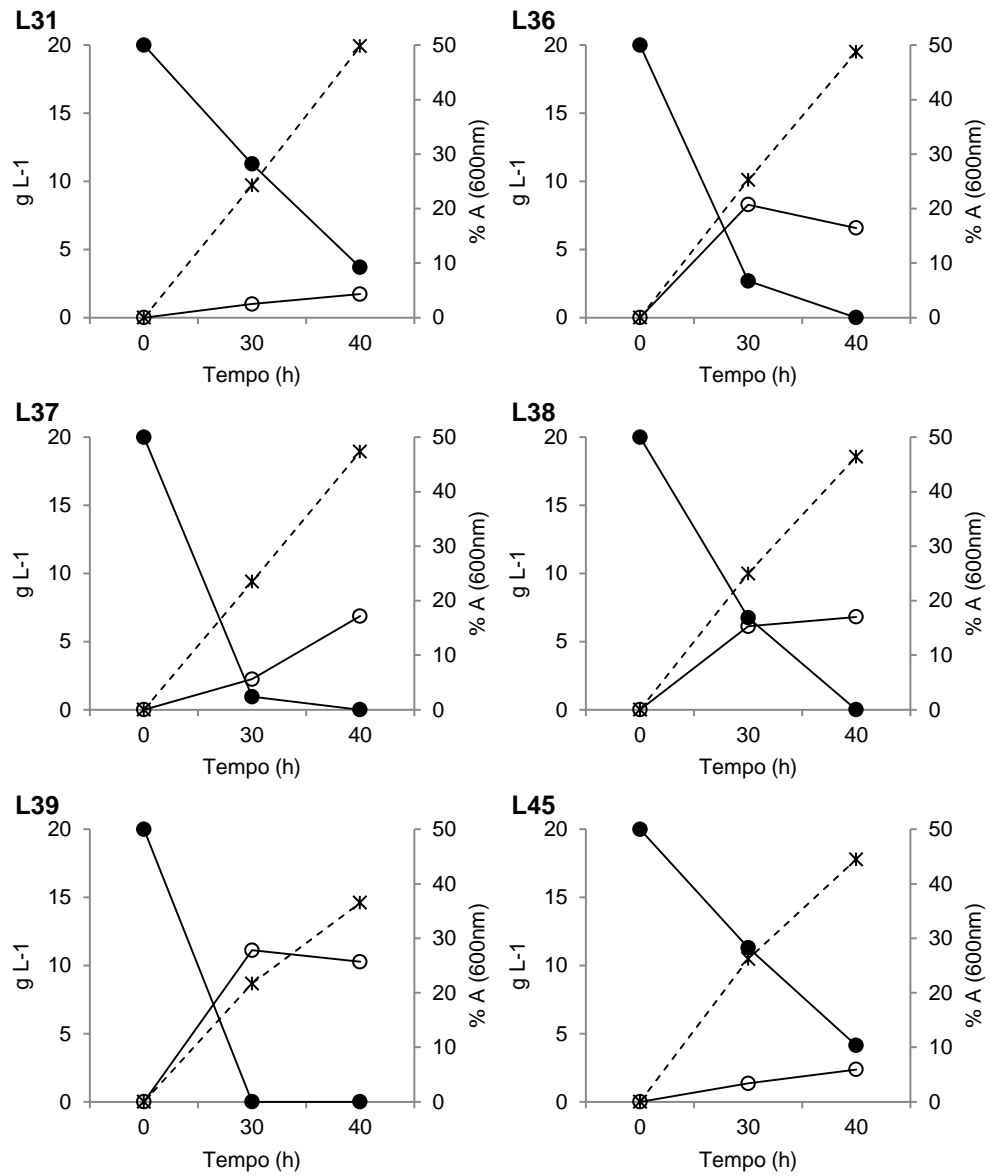
<sup>1</sup> Número de acesso da sequência no NCBI. <sup>2</sup> Táxon definido pelo BLAST NCBI.



**Figura 7** – Assimilação de D-xilose (●); produção de xilitol(o); produção de etanol (◆) e crescimento celular (×) para os isolados NRRL-Y (controle) L3, L4, L5, L7, L8, L9 e L11.



**Figura 8** – Assimilação de D-xilose (●); produção de xilitol (o) e crescimento celular (x) para os isolados L13, L15, L17, L20, L22, L24, L25 e L26.



**Figura 9** – Assimilação de D-xilose (●); produção de xilitol (○) e crescimento celular (×) para os isolados L31, L36, L37, L38, L39 e L45.

## 5 DISCUSSÃO

As comunidades de bactérias celulolíticas e hemicelulolíticas isoladas do trato digestivo *M. fryanus*, *S. levis* e *T. licus licus* apresentaram similaridades, sendo majoritariamente constituídas por representantes dos mesmos gêneros e espécies do filo Firmicutes. O número relativo de isolados bacterianos cultiváveis, que apresentaram degradação para os compostos, variou entre 12-14 % nos insetos praga testados. Saldarriaga (2009) relatou em larvas das pragas de cana-de-açúcar de *D. saccharalis* e *S. frugiperda*, respectivamente, 18,6 % e 0 % dos isolados com alguma degradação, sugerindo que esses achados poderiam estar relacionados com o hábito alimentar desses insetos.

Bactérias que degradam celulose e hemicelulose têm sido isoladas do trato digestivo de insetos que se alimentam em dietas ricas em substratos celulósicos como cupins (SAXENA BAHADUR; VARMA, 1993; SCHAFER et al. 1996; VARMA et al. 1994; WENZEL et al. 2002), baratas (CRUDEN; MARKOVETZ, 1979) entre outros. Os resultados obtidos com *M. fryanus*, *S. levis* e *T. licus licus* corroboram com a observação já que as três espécies pragas apresentam desenvolvimento das larvas em tecidos ricos em materiais lignocelulósicos como colmos, rizomas e toletes de plantio.

As bactérias que apresentaram atividade enzimática para a celulose, tiveram sequência de rRNA 16S relacionadas a *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. amyloliquefaciens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae* e *Citrobacter farmeri*. Essas espécies são reportadas por diversos autores como degradadoras de compostos lignocelulósicos (ANAND, et al., 2010; BI; RICE; PRESTO, 2009; LEE et al., 2006; NISHIKAWA; SUTCLIFFE; SADDLER., 1988; REZAEI et al., 2009).

Os isolados relacionados a *B. amyloliquefaciens* se destacaram dos demais por apresentarem para a celulose índice de atividade enzimática pelo menos 5 vezes maiores que o utilizado para definir a degradação. Ibrahim et al. (2012) encontraram alta atividade celulítica de *B. amyloliquefaciens* (halos de 20,0 mm em meio CMC ágar) e reportaram que o microrganismo possui uma endoglucanase moderadamente termofílica com atividade máxima a 55 °C. Bischoff et al. (2006) e Nurachman et al. (2010) também reportam o isolamento de endoglucanases moderadamente termofílicas para o mesmo microrganismo.

Nas comunidades de fungos, leveduras e organismos leveduriformes isoladas dos tratos digestivos de *M. fryanus*, *S. levis*, *T. licus licus* e *D. saccharalis*, houve predominância de representantes do filo Ascomycetes, com poucos representantes do filo Basidiomycetes. Suh e Blackwell (2005) evidenciaram que tal relação é também verdadeira para besouros de diversos taxa. Majoritariamente, os isolados obtidos no isolamento dos quatro insetos praga foram leveduras verdadeiras (Saccharomycetes), consideradas como os fungos endossimbióticos mais conhecidos em insetos (SUH; NODA; BLACKWELL, 2001).

Os fungos filamentosos isolados do trato digestivo dos quatro insetos aparecem relacionado a microrganismos cuja capacidade de degradação já foi descrita para alguns dos compostos utilizados nesse estudo. *Penicillium manfreei* e *Aspergillus fumigatus* têm capacidade de degradação demonstrada para xilano (FLANNIGAN; SELLARS, 1978; FEDOROVA et al., 2007; SILVA et al., 1999; WONG et al. 2001). O fungo entomopatogênico *Pyrenophora teres f. teres* tem uma grande proporção de genes que codificam para hidrolases associadas com a degradação de carboidratos da parede celular da planta, presumivelmente usadas pelo fungo para degradar tecido da planta durante o crescimento necrotrófico (ELLWOOD et al., 2010). Isolados do tubo digestivo de três dos insetos testados tiveram sequências relacionadas a este gênero.

Para as leveduras e outros microrganismos leveduriformes, ao todo nove gêneros foram relacionados aos isolados cultiváveis de *M. fryanus*, *S. levis*, *T. licus licus* e *D. saccharalis* através do sequenciamento região D1/D2 do 26S rDNA. Berbee e Taylor (1999) descreveram para as leveduras o gene 18S rDNA como informativo dos níveis taxonômicos superiores, os domínios 1/2 do 26S rDNA informativo ao nível de gênero e espécie e a região do espaçador interno (ITS) divergente ao nível de espécie.

Para os insetos estudados, 91,3 % dos isolados apresentaram sequências relacionadas aos gêneros *Meryerozyma*, *Candida*, *Scheffersomyces* e *Pichia*. Esses gêneros são recorrentes em trabalhos que associam leveduras ao trato gastrointestinal de insetos (LONG et al., 2012; RIVERA et al., 2009; SUH; BLACKWELL, 2005). Espécies como *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Meryerozyma (Pichia) guilliermondii* e *Candida lusitane* aparecem associadas a besouros (SUH; BLACKWELL, 2005b). Os organismos leveduriformes, isolados apenas em larvas de *S. levis* foram relacionados a *Prototheca zopfii* var. *hydrocarborea*, microrganismo

relacionado à degradação de hidrocarbonetos (YAMAGUCHI; ISHIDA; SUZUKI, 1999). Isolados de *Prototheca zopfii* foram relatados em associação aos sítios de alimentação de larvas de *Sigalgaita* sp. (Lepdoptera) em cactos *Pilosocereus arrabidae* (ROSA et al., 1992).

A análise das sequências evidenciou uma maior diversidade de leveduras isoladas do mesêntero de *D. saccharalis* quando em comparação aos outros insetos. No entanto, no trato de *M. fryanus* que encontra-se a relação mais representativa entre o total e isolados que apresentaram alguma degradação (50,0% em *M. fryanus* contra 14,3% de *D. saccharalis*). Nas dissecações do trato digestivo de *D. saccharalis*, Saldarriaga (2009) relata não terem sido observadas fibras de celulose na região do mesêntero, sugerindo que ou a digestão deste material é extremamente eficiente no inseto ou que este inseto não ingere as fibras "selecionando" o caldo da cana. A presença de poucos isolados com capacidade degradativa pode sugerir que talvez o inseto esteja selecionando o caldo da cana em detrimento às fibras.

A capacidade de degradação evidenciada em 54 % das leveduras e organismos leveduriformes apareceu distribuída, sem que houvesse uma relação direta com a identidade do isolado. Por exemplo, para as leveduras associadas ao gênero *Meryozyma* foram verificadas diferenças na degradação de compostos entre os isolados de *M. fryanus*, *S. levis* e entre isolados provenientes de *D. saccharalis* criadas em dieta artificial e de insetos coletados de plantas em campo.

Em estudo realizado por Rivera et al. (2007) com objetivo de elucidar a diversidade de leveduras associada a diferentes espécies de besouro do gênero *Dendroctonus*, os autores observaram que as leveduras associadas aos besouros exibiram uma resposta fisiológica altamente variável dentro e entre os grupos sem que houvesse uma correlação entre os grupos e a assimilação ou fermentação dos carboidratos testados.

Esse fato chama atenção, uma vez que estimativas apontam que apenas 1% das espécies existentes de leveduras foram classificadas e identificadas (FELL et al., 2000). Suh et al. (2005b) mostraram que em 650 leveduras isoladas do intestino de besouros, utilizando a região D1/D2 da LSU do 26S rDNA, 39 isolados apresentaram sequências idênticas a de leveduras previamente descritas, 55 isolados apresentaram sequências diferindo entre 1–5 pb das leveduras existentes e que 196 isolados diferam em mais de 5pb do genótipo mas próximo conhecido de levedura.



Os resultados obtidos para as leveduras e leveduriformes isolados nos quatro insetos praga da cana-de-açúcar, evidenciam que 11 isolados apresentaram sequência idêntica à referência, enquanto que 87 isolados apresentaram sequências que diferiram em até 1 % da sequência mais próxima e 20 isolados apresentaram mais que 5 % de diferença.

Na análise de distância evolutiva verificou-se divergências nas comparações entre os isolados de um mesmo grupo (espécies pré-definidas pelo BLAST). Nesse caso, a diversidade de UTOs pode ser explicada pela falta de resolução do domínio de 26S da região D1/D2 em separar duas sequências. Dificuldades desse tipo foram relatadas por Vaughan-Martini et al. (2005), quando descreveram a proposta da nova espécie *Meyerozyma caribbica* e constataram uma diferença mínima, na sequência de 26S da região D1/D2, quando comparadas com *M. guilliermondii*, propondo a necessidade de estudos filogenéticos com mais de um gene para estas espécies.

Nas análises de distância evolutiva que relacionaram sequências obtidas de microrganismos isolados em pragas de espécies diferentes, obteve-se um número ainda maior de UTOs, indicando que a diversidade das leveduras encontradas no intestino dos insetos praga estudados é substancialmente diferente. A presença das leveduras depende, em grande parte, do resultado de interações dentro do intestino dos insetos: aquelas com o inseto em si, com o substrato de alimentação e entre os microrganismos ingeridos com o substrato de alimentação (RIVERA et al., 2009; SUH et al., 2003). Apesar de existirem poucos trabalhos sobre os papéis de comunidades de leveduras no trato intestinal dos insetos (BRAND et al., 1977; DELALIBERA; HANDELSMAN; RAFFA, 2005; LEUFVÉN et al., 1984) acredita-se que as leveduras desempenhem um papel muito importante no contexto nutricional (DOWD 1989, 1991; RIVERA et al., 2009; SUH et al., 2003; SUH; NODA; BLACWELL, 2001).

No ensaio para avaliação da produção de xilitol e etanol, com exceção do controle *Pichia* NRRL-Y, os isolados testados apresentaram produção discreta de etanol, no limite de detecção do método ( $< 0,05 \text{ g L}^{-1}$ ). Em leveduras e demais organismos eucariotos, a conversão de D-xilose a D-xilulose ocorre em duas etapas: inicialmente D-xilose é reduzida a D-xilitol, pela enzima xilose redutase (XR); em seguida, D-xilitol é oxidado a D-xilulose, pela enzima xilitol desidrogenase (XDH). D-xilulose é fosforilada pela enzima xilulose quinase (XK), a D-xilulose 5-P. A D-

xilulose 5-P é convertida da mesma maneira em bactérias e fungos a gliceraldeído-3-P e frutose 6-P, ingressando na via da glicólise, chegando a piruvato que é convertido a etanol e vários outros produtos (PITKÄNEN, 2003).

Algumas hipóteses podem ser levantadas na tentativa de explicar a detecção discreta de etanol para os isolados. Uma delas encontra-se na própria rota de conversão da D-xilose. As enzimas XR e XDH possuem cofatores distintos (redutases com preferência por NADPH e desidrogenases que utilizam apenas NAD<sup>+</sup>) (JEPPSON et al., 2002; SALEH et al., 2006) provocando, assim, um desequilíbrio redox e impedindo a utilização anaeróbica desses açúcares. Essa é uma das principais causas de excreção de xilitol (PETSCHACHER e NIDETZKY, 2008).

Outra explicação seria que microrganismos selvagens às vezes possuem rotas bioquímicas diferentes para a utilização da biomassa, com conversão em outros produtos (SALES et al., 2006). No caso dos isolados L7, L31, L45, que consumiram a xilose presente no meio sem que isso se traduzisse em alta concentração de xilitol, o piruvato pode ter sido direcionado para a produção de compostos tais como ácido láctico, biomassa ou para oxidação de dióxido de carbono e água nos processos respiratórios (JEFFIRES, 1983; MAAS, et al., 2008; SCHNEIDER, 1989).

Com relação as dosagens de xilitol, o isolado que apresentou a maior eficiência na conversão de xilose em xilitol foi o organismo leveduriforme L39, do trato gastrointestinal de *S. levis*, cuja sequência de maior similaridade foi *Prototheca zopfii* var. *hydrocarborea*. Não existem relatos de produção de xilitol por esse microorganismo. Para esse isolado, os rendimentos em xilitol são semelhantes, nessas condições de cultivo, aos coeficientes de rendimentos  $Y_{p/s}$  de 0,51 g g<sup>-1</sup> xilose; e  $Q_p$  de 0,27 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> encontrados por Lourenço 2009 com a cepa de referência *Candida guilliermondii* FTI 20037 uma das leveduras mais utilizadas até agora para a produção de xilitol.

Nas observações realizadas, para todas as leveduras relacionadas ao gênero *Meyerozyma* o rendimento de xilitol variou entre 0,11 a 0,46 g g<sup>-1</sup> de xilose consumida, enquanto que para isolados com sequências relacionadas ao gênero *Candida* o rendimento de xilitol variou entre 0,24 a 0,48 g g<sup>-1</sup> de xilose consumida. Rao et al. (2007) obtiveram para 12 leveduras isoladas do trato gastrointestinal de besouros rendimento de xilitol entre 0,12 a 0,58 g g<sup>-1</sup> de xilose consumida, sendo

que nas leveduras identificadas como *Candida* sp., o rendimento de xilitol apresentado variou em uma faixa entre 0,16 e 0,52 g g<sup>-1</sup> de xilose consumida. Autores como Lu et al. (1995) e Preziosi-Belloy, Nollet e Navarro (2000) citam rendimentos ainda maiores de xilitol, entre 0,80 e 0,87 g g<sup>-1</sup> xilose, respectivamente para *Meyerozyma (Candida) guilliermondii* e *Candida* sp. L-102.

Os resultados de produção de xilitol após 40 h para as linhagens L9, L15, L17, L24, L26, L31 parecem sugerir que maiores produções de xilitol poderiam ter sido geradas caso o experimento fosse prolongado. Isso porquê no processo hidrolítico de materiais hemicelulósicos, compostos tóxicos ao metabolismo microbiano como o ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, compostos fenólicos e íons metálicos podem ser gerados, afetando a produtividade volumétrica das fermentações e, de acordo com Parajó, Domínguez e Domínguez (1998), limitando o consumo da fonte de carbono e reduzindo a cinética de crescimento. De fato, processos de bioconversão em microrganismos são influenciados pelas condições ambientais tais como temperatura, concentração de xilose, pH do meio de cultivo, concentração do inóculo, estado fisiológico do inóculo, taxa de aeração, entre outros.

Alguns dos isolados testados para a produção de xilitol ou etanol mostraram em meio líquido capacidade de consumo da xilose e no entanto, não apresentaram produção de enzimas para a degradação do xilano em meio sólido (isolados L1, L5, L8, L17, L20 e L31) (Figuras 8 e 9). O fato chama atenção, pois em geral, xilanases são encontradas em leveduras que consomem a xilose (BIELY et al., 1978; CADETE, 2009; MALABADI; RAGHVENDRA; KUMAR, 2007) e algumas hipóteses podem ser levantadas. Autores já relataram que a condição física do meio de cultivo pode influenciar na capacidade de hidrólise de substratos. Goldbeck et al. (2012) observaram leveduras que mostraram capacidade de hidrólise enzimática alterada para a celulose dependendo da condição física do meio de cultivo (sólido ou líquido). Tal fato poderia também estar relacionado com os resultados de hidrólise obtidos para os isolados meio sólido. Por outro lado, as leveduras testadas aqui fazem parte de complexo microambiente ainda não totalmente entendido. Relações complexas envolvendo outros organismos poderiam possibilitar que leveduras que não produzem xilanases co-habitassem o tubo intestinal utilizando a D-xilose como fonte de carbono. Nesse sentido, estudos adicionais se fazem necessários para a interpretação precisa desses resultados.



## 6 CONCLUSÕES

O trato gastrointestinal de larvas de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis* estudadas nesse trabalho mostrou ser um reservatório importante de novos microrganismos que apresentam capacidade de degradação enzimática para os compostos celulose e xilano. Os resultados preliminares de degradação apresentados pelos isolados microbianos dos insetos testados fornecem subsídios para prosseguimento da pesquisa do potencial de celulasas e hemicelulasas produzidas por microrganismos isolados nessas pragas de cana-de-açúcar.

O método de difusão radial em meio sólido, utilizado aqui, indicou a atividade de degradação de forma qualitativa, através do índice de atividade enzimática (I.E.), uma ferramenta prática que facilita e acelera a seleção e a comparação da produção enzimática entre diversos isolados microbianos. Dentre os isolados testados, destacaram-se na produção de celulasas as bactérias relacionadas a *Bacillus amyloliquefaciens* com medidas de halos de hidrólise que chegaram a 35 mm de diâmetro. Entre fungos, leveduras e organismos leveduriformes os índices de atividade enzimática foram mais destacados para a degradação da hemicelulose. Os fungos filamentosos que apresentaram maior hidrólise de xilano, foram relacionados aos gêneros *Pyrenophora*, *Aspergillus* e *Penicillium*. Já as leveduras com capacidade hidrolítica destacada foram relacionadas às espécies *Meyerozyma guilliermondii*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida pseudointermedia*, *Candida parapsilosis*, *Candida solani* e *Aureobasidium pullulans*. Os organismos leveduriformes não apresentaram atividade enzimática expressiva nos compostos testados.

As sequências de DNA extraídas dos isolados mostram que o trato intestinal das pragas estudadas abriga muitos microrganismos provalvemente ainda não descritos na literatura uma vez que a análise da similaridade realizada com as leveduras isoladas evidenciou sequências que divergiram mais de 1 % das sequências depositadas no *GeneBank* (NCBI). Além, as análises de divergência evolutiva evidenciam poucos microrganismos habitam o trato intestinal das pragas de espécie diferentes.

No ensaio realizado para a triagem de microrganismos com capacidade de conversão de xilose para a produção de xilitol e etanol, foram obtidos rendimentos de xilitol em um isolado leveduriforme, relacionado a *Prototheca zopfi* var. *hydrocarbonea*, semelhantes aos da levedura mais utilizada até agora para a produção do composto. No caso da conversão da D-xilose em etanol o rendimento apresentado pelos isolados foi bastante discreto, podendo estar relacionado às condições de cultivo e até mesmo ao metabolismo desses isolados.

Através do ensaio de conversão da D-xilose (realizado em meio líquido) pode-se verificar para algumas diferenças nos perfis de degradação quando em comparação com os dados obtidos em meio sólido; estudos direcionados a essas diferenças poderiam revelar se o perfil de degradação está associado às condições físicas do meio de cultivo ou se esses resultados estão relacionados aos intrincados processos que ocorrem no tubo intestinal dos insetos praga estudados.

Os resultados desse trabalho, que apresentam potencialidades de cada isolado, têm importância para utilização na biotecnologia industrial. Microrganismos com combinações específicas de atividades enzimáticas têm potencial para diversas aplicações, tais como a produção de bioenergia e biocombustíveis, ou aplicação nas indústrias têxteis e de papel ou ainda no processamento de alimentos. Cabe ressaltar ainda que o conhecimento funcional do trato gastro-intestinal dos insetos é de grande relevância para se entender a dinâmica de cadeias envolvidas biologia destes organismos. Destaca-se, assim, a importância da realização de estudos futuros para um maior conhecimento sobre a diversidade e as funções exercidas por estes microrganismos no microambiente do trato intestinal e de suas interações com o hospedeiro.

## REFERÊNCIAS

AFFLECK, R. P. **Recovery of Xylitol from fermentation of model hemicellulose hydrolysates using membrane technology**. 2000, 104 f. Dissertação (Master of Science in Biological Systems Engineering) - Virginia Polytechnic Institute, Virginia State University, Blacksburg, 2000.

ALPER, H.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 7, p. 715–723. 2009.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANAGNOSTAKIS, S. L.; HANKIN, L. Use of selective media to detect enzyme production by microorganisms in food products. **Journal of Milk and Food Technology**, Corse, v. 38, p. 570-572, 1975.

ANAND, A. A. P. et al. Isolation and characterization of bacteria from the gut of Bombyx mori that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. **Journal of Insect Science**, Madison, v. 10, n. 107, p. 1-20, 2010.

ANDERSON, I. C.; CAMPBELL, C. D.; PROSSER, J. I. Diversity of fungi in inorganic soils under a moorland–Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) gradient. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 1121-1132, 2003.

ARRIGONI, E. B. et al. Aplicação de *Neoplectana carpocapsea* Weiser, 1955 em condições de campo para o controle de *Migdolus spp.* (Coleoptera: Cerambycidae). **Nematologia Brasileira**, Piracicaba, v. 8, p. 181-189, 1986.

AYRES, M. P. et al. Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. **Ecology**, Washington, v. 81, n. 8, p. 2198-2210, 2000.

BADGER, P.C. Ethanol from cellulose: a general review. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Eds.). **Trends in new crops and new uses**. Alexandria: American Society for Horticultural Science, 2002. p. 17–21.

BENEDINI, M. S.; CONDE, A. J. Broca gigante: nova praga da cana-de-açúcar na região centro-sul. **Revista Coplana**, Guariba, p. 24-25, set. 2008.

BERBEE, L. M.; TAYLOR, J. W. Fungal phylogeny. In: OLIVER, P. R.; SCHWEIZER, M. (Eds.). **Molecular fungal biology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1999. p. 21–77.

BHADRA, B. et al. *Pichia cecembensis* sp. nov. isolated from a papaya fruit (*Carica papaya* L., Caricaceae). **FEMS Yeast Research**, London, v. 7, p. 579–584, 2007.

BI, C.; RICE, J. D.; PRESTO, J. F. Complete fermentation of Xylose and Methylglucuronoxyllose derived from Methylglucuronoxyllose by *Enterobacter*

*asburiae* Strain JDR-1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 2, p. 2 395-404, 2009.

BISCHOFF, K. M. et al. Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, Berlin, v. 28, n. 21, p. 1761-1765, 2006.

BIELY, P.; KREMICKY, L. Yeasts and their enzyme systems degrading cellulose, hemicelluloses and pectin. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 36, p. 261–352, 1998.

BIELY, P. et al., Xylan-degrading activity in yeasts: growth on xylose, xylan and hemicelluloses. *Folia Microbiology*, Praha, v. 23, n. 5, p. 366-71, 1978.

BIER, M. C. J. et al. Crescimento e consumo de Xilose de *Candida guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. **Evidência**, Joaçaba, v. 7, n. 2, p. 119-130, 2007.

BIGNELL, D. E.; EGGLETON, P. On the elevated intestinal pH of higher termites (Isoptera, Termitidae). **Insectes Sociaux**, Paris, v. 42, p. 57-69, 1995.

BLACKWELL, M.; JONES, K. G. Taxonomic diversity and interactions of insect-associated ascomycetes. **Biodiversity and Conservation**, Berlin, v. 6, p. 689–699, 1997.

BRAGA, D. P. V. **Caracterização de duas variedades de cana-de-açúcar transformadas geneticamente com o gene que codifica a proteína cry1A(B) de *Bacillus thuringiensis* (Bt) para resistência a *Diatraea saccharalis* (Lepidóptera: Crambidae)**. 2001. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BRANCO, R. F. **Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como alternativa às vias química e microbiológica de obtenção**, 2010. 133 f. Tese (Doutor em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

BRAND, J. M. et al. Production of verbenol pheromone by a bacterium isolated from bark beetles. **Nature**, London, v. 254, p. 136-137, 1975.

BRAND, J. M.; SCHULTZ, J.; BARRAS, S. J.; EDSON, L. D.; PAYNE, T. L.; HEDDEN, R. L. Bark beetle pheromones: enhancement of *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Scolytidae) aggregation pheromone by yeast metabolites in laboratory bioassays. **Journal of Chemical Ecology**, Berlin, v. 3, p. 657–666, 1977.

BRECCIA, J. D. et al. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 22, p. 42-49, 1998.



BRENNAN, Y. et al. Unusual microbial xylanases from insect guts. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 3609–3617, 2004.

BREZNAK, J. A.; BRUNE, A. Role of microorganism in the digestion of lignocellulose by termites. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 39, p. 453-487, 1994.

BREZNAK, J. A. Phylogenetic diversity and physiology of termite gut spirochetes. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 42, p. 13-18, 2002.

BRIDGES, J. R. Nitrogen-fixing bacteria associated with bark beetles. **Microbial Ecology**, New York, v. 7, p. 131-137, 1981.

BRUNE, A.; FRIEDRICH, M. Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 3, p. 263–269, 2000.

BÜCHNER, P. Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms. In.: Malke, H. (Ed.). **Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologi**, New York, v. 7, n. 2, p. 168, 1967.

BUZZI, Z. J. **Entomologia didática**. 4. ed. Curitiba: UFPR Editora, 2002.

CADETE, R. M. **Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose, L-arabinose ou D-celobiose e produtoras de celulases e xilanases associadas à madeira em decomposição**. 2009. 39 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CAMPBELL, B. C. On the role of microbial symbiontes in herbivorous insects. In: BERNAYS, E. (Ed.). **Insect-plant interactions**. Boca Raton: CRC Press, 1990. cap.1, p. 1-44.

CAZEMIER, A. E. et al. *Promicromonospora pachnodae* sp. nov., a member of the (hemi) cellulolytic hindgut flora of larvae of the scarab beetle *Pachnoda marginata*. **Antonie Leeuwenhoek**, Berlin, v. 83, p. 135–148, 2003.

CESKA M. Enzyme catalysis of solidified media. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 71, n. 22, p. 186-192, 1971.

CHEN, P. J. et al. Purification and characterization of carboxymethylcellulase from *Sinorhizobium fredii*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taipei, v. 45, p. 111-118, 2004.

CRUDEN, D. L.; MARKOVETZ, A. J. Carboxymethylcellulose decomposition by intestinal bacteria of cockroaches. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 38, p. 369- 372, 1979.

DAHIYA J. S. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. **Canadian Journal Microbiology**, Saskatoon, v.37, p.14-18, 1991.

DASCH, G. A.; WEISS, E.; CHANG, K. P. Endosymbionts of insects. In: Krieg, N.R.; Holt, J.G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1984. p. 811-813.

DELALIBERA, I.; HANDELSMAN, J.; RAFFA, A. K. Contrasts in Cellulolytic Activities of Gut Microorganisms between the wood borer, *Saperda vestita* (Coleoptera: Cerambycidae), and the bark beetles, *Ips pini* and *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera: Curculionidae). **Enviromental Entomology**, Lanham, v. 34, n. 3, p. 541-547, 2005.

DEN HANN, R.; VAN ZYL, W. H. Enhanced xylan degradation and utilization by *Pichia stipitis* overproducing fungal xylanolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 33, n. 5, p. 620-628, 2003.

DE Vries, R. P.; Visser, J.; Graaff, L. H.. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 150, p. 281-285, 1999.

DILLON, R. J.; DILLON, V. M. The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interactions. **Annual Review of Entomology**, Standford, v. 49, p. 71-92, 2004.

DOUGLAS, A. E.; MINTO, L. B.; WILKINSON, T. L. Quantifying nutrient production by the microbial symbionts in an aphid. **The Journal Experimental Biology**, Cambridge, v. 204, p. 349-358, 2001.

DOWD, P. F. Symbiont-mediated detoxification in insect herbivores. In: Barbosa, P.; Krischik, V.; Jones, C. (Eds.). **Microbial mediation of plant-herbivore interactions**. New York: John Wiley, p. 411-440, 1991.

DOWD, P. F. *In situ* production of hydrolytic detoxifying enzymes by symbiotic yeasts of cigarette beetle (Coleoptera: Anobiidae). **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 82, p. 396-400, 1989.

DOWD, P. F. Insect fungal symbionts: a promising source of detoxifyinenzymes. **Journal of Industrial Microbiology**, Berlin, v. 9, p. 149-161, 1992.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 32, p. 1792-1797, 2004.

ELLWOOD, S. R. et al. A first genome assembly of the barley fungal pathogen *Pyrenophora teres* f. *teres*. **Genome Biology**, Berlin, v. 11, p.109, 2010.

FEDOROVA, N. D. et al. The genome sequence of *Penicillium marneffe* strain ATCC 18224. EMBL/GenBank/DDBJ Databases, 2007. Disponível em <<http://www.uniprot.org/uniprot/B6QQZ9>>. Acesso em 4 jun. 2012.

FELSENSTEIN J. Confidence-limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, New York, v. 39, p. 783-791, 1985.

FELL, J. W. et al. A.. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large- subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Giessen, v. 50 p. 1351-1371, 2000.

FLANNIGAN, B.; SELLARS, P. N. Production of xylolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus*. **Transactions of the British Mycological Society**, London, v. 71, n. 3, p. 353–358, 1978.

FUNGARO, M. H. P.; MACCHERONI JR., W. Melhoramento genético para produção de enzimas aplicadas à Indústria de Alimentos. In: MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C.; NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C. (Eds.). **Recursos genéticos e melhoramento: microrganismo**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. p. 426-453.

GALLO, D. et al. Manual de entomologia agrícola. 10. ed. Piracicaba: FEALQ. 2002. 920 p.

GAMUNDI, I. J.; STECIOW, M. Acción enzimática de algunos hongos que descomponen la hojarasca de *Nothofagus dombeyi*. III. Actividad celulótica y competencia por la celulosa. **Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, Buenos Aires, v. 40, p. 255-272, 1988.

GEIB S. M. et al. Lignin degradation in wood-feeding insects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, n. 35, p. 12932–12937, 2008.

GENTA, F. A. et al. Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. **Journal of Insect Physiology**, Amsterdam, v. 52, p. 593-601, 2006.

GIJZEN H. J. et al. Effect of host diet and hindgut microbial composition on cellulolytic activity in the hindgut of the American cockroach, *Periplaneta americana*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1822–26, 1994.

GOLDBECK, et al. Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes. **African Journal of Biotechnology**, Victoria Island, v. 11, n. 53, p. 11595-11603, 2012.

GRANSTROM, T.; ARISTIDOU, A. A.; LEISOLA, M. Metabolic flux analysis of *Candida tropicalis* growing on xylose in an oxygen-limited chemostat. **Metabolic Engineering**, v. 4, p. 248-256, 2002.

GUPTA P.; SAMANT, K.; SAHU, A. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. **International Journal of Microbiology**, New York, v. 2012, p. 1-5, 2012.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HALL, B. G. **Phylogenetic trees made easy**: a how-to manual. Sunderland: Sinauer Associates, 2008.

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Celi wall structural foundations: molecular basis for improving forage digestibilities. **Crop Science**, v. 39, p. 27-37, 1999.

HEIKKILA, H. et al. **Method for producing xylitol**. U.S. patent 5,998,607, 1999.

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 3233-3241, 1997.

HYVONEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, New York, v. 27, p. 373-403, 1982

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, p. 754-755, 2001.

IBRAHIM, M. et al. *Adansonia digitata* (Baobab) fruit pulp as substrate for *Bacillus* Endoglucanase production. **Research in Biotechnology**, v. 3, n.2, p. 01-07, 2012.

ISHIKAWA H. Insect symbiosis: an introduction In: Bourtzis, K.; Miller, A. T. (Eds.). **Insect symbiosis**. Boca Raton: CRC Press, 2003. p. 1–22.

JACOB, F.; MONOD, J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. **Journal of Molecular Biology**, Boston, v. 3, p. 318-356, 1961.

JEFFRIES, T. W.. Utilization of xylose by bacteria, yeast and fungi. **Advances in Biochemistry and Biotechnology**, New York, v.27 p.2-27, 1983.

JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Advances in Applied Microbiology**, v. 47, p. 221–268, 2000.

JEFFRIES, T. W.; KURTZMAN, C. P. Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose-fermenting yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v. 16, 922–932, 1994.

JEPPSON, M., et al. Reduced oxidative pentose phosphate pathway flux in recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strains improves the ethanol yield from xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1604-1609, 2002.

KANE, M.D.; BREZNAK, J.A. Effect of host diet on production of organic acids and methane by cockroach gut bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, n.57, p. 2628–34, 1991.

KASTEN JR, P. et al. **Ocorrência de *Migdolus spp.* e insetos associados em solo de textura arenosa (Areias quartzosas)**. Boletim Técnico Copersucar, 1985, n.32, p.29-32.

KIM, N. et al. Molecular cloning and characterization of a glycosyl hydrolase family 9 cellulase distributed throughout the digestive tract of the cricket *Teleogryllus emma*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology** v.150, 368–376, 2008.

KIM, S-Y., KIM, J-H.; OH, D-K. Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, p. 267- 270, 1997.

KRISHNA, S. H.; REDDY, T. J.; CHOWDARY, G. V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using thermotolerant yeast. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 193-196, 2001.

KROKENE, P.; SOLHEIM, H. Pathogenicity of four blue - stain fungi associated with aggressive and nonaggressive bark beetles. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 88, p. 39-44, 1998.

KURTZMAN, C. P. *Candida shehatae*—genetic diversity and phylogenetic relationships with other xylose-fermenting yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, Berlin, v. 57, p.215–222, 1990.

KURTZMAN, C.P.; ROBNETT, C.J. Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 50 end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p.1216–1223, 1997.

KURTZMAN, P. C.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Berlin, v. 73, p. 331–371, 1998.

LACHANCE, M. A.; BOWLES J. M.; STARMER, W. T. Geography and niche occupancy as determinants of yeast biodiversity: the yeast–insect–morning glory ecosystem of Kapuka Puauulu, Hawai'i. **FEMS Yeast Research**, London, v. 4, p. 105–111, 2003a.

LACHANCE, M. A.; BOWLES, J. M.; Starmer, W. T. *Metschnikowia santaceciae*, *Candida hawaiiiana*, and *Candida kipukae*, three new yeast species associated with insects of tropical morning glory. **FEMS Yeast Research**, London, v. 3, p. 97–103, 2003b.

LACHANCE, M.-A.; STARMER, W. T. Ecology and yeasts. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W. (Eds.). **The yeasts: a taxonomic study**. 4. ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 21–34

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, New York, v. 77. p. 348-352, 1994.

LEATHERS, T. D.; GUPTA, S. C. Xylitol and riboflavin accumulation in xylose-grown cultures of *Pichia guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 47, p. 58–61, 1997.

LEE, Y. J. et al. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. **Bioresource Technology**, London, v. 99, n. 2, p.378-86, 2008.

LEITE, R. S. R. ; ALVES-PRADO, H. F. ; GOMES, E. ; SILVA, R. . Seleção de Substratos para a Produção de B-glicosidase em Estado Sólido pelo Microrganismo *Thermoascus aurantiacus*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: UFSC, 2003. p. 1-7.

LEITE, L. G. et al. Alternativa de controle: bicudo da cana-de-açúcar. **Revista Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, n. 83, mar. 2005.

LEUFVÉN, A.; BERGSTRÖM, G; FALSEN, E. Oxygenated monoterpenes produced by yeasts, isolated from *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae) and grown in phloem medium. **Journal of Chemical Ecology**, Berlin, v.14, p.353–361, 1988.

LIM, Y. W. et al. Determining fungal diversity on *Dendroctonus ponderosae* and *Ips pini* affecting lodgepole pine using cultural and molecular methods. **Fungal Diversity**, Berlin, v. 19, p. 79–94, 2005.

LIMA, L. H. A.; FELIPE, M. G. A.; TORRES, A. G. T. Reclassification of *Candida guilliermondii* FTI 20037 as *Candida tropicalis* based on molecular phylogenetic analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, 2003.

LOPES, F. et al. Thermo-stable xylanases from non conventional yeasts. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, New York, v. 3, n. 3, p. 36-42, 2001.

LOURENÇO, M. V. M. **Seleção de leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol**. 2009, 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2009.

LU, J. et al. Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida* sp. L- 102. **Biotechnology Letters**, Berlin, v. 17, p. 167–170, 1995.

LYND, L. R. et al. Fuel ethanol from cellulosic biomass. **Science**, Washington, v. 251, n. 4999, p. 1318-1323, 1991.

LYND, L. R. et al. How biotech can transform biofuels. **Nature Biotechnology**, London, v. 26, p. 169–172, 2008.

MAAS, R. H. W. et al. Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: effect of growth and respiration on L(+)-lactic acid production. **The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 35, p. 569–578, 2008.

MALABADI, R. B.; RAGHVENDRA, K. S. V. Production of cellulase-free Xylanase from a novel yeast strain used for biobleaching in paper industry. **Research Journal of Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 24-33, 2007.

MATTANOVICH, D. et al. Open access to sequence: browsing the *Pichia pastoris* genome. **Microbial Cell Factories**, Washington, v. 53, p. 8, 2009.

MESHITSUKA, G., LSOGAY, A. Chemical structures of cellulose, hemicelluloses and lignins. In: HON, D. N. S. (Ed.) **Chemical modification of lignocellulosic materials**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.11.

MONOD, J.P.; JACOB, F. Allosteric proteins and cellular control systems. **Journal of Molecular Biology**, Boston, v. 6, p. 306–329, 1963.

NARDON, P.; GRENIER, A. M. Endosymbiosis in Coleoptera: biological, biochemical, and genetic aspects. In: SCHWEMMLER, W.; GASSNER, G. (Eds.). **Insect endocytobiosis: morphology, physiology, genetics, evolution**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 175-216.

NGUYEN, N. H. et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, p. 1232–1241, 2006.

NISHIKAWA, N. K.; SUTCLIFFE, R.; SADDLER, J. N - The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5-6, p. 549-552, 1988.

NURACHMAN, Z. et al. Cloning of the Endoglucanase Gene from a *Bacillus amyloliquefaciens* PSM 3.1 in *Escherichia coli* Revealed Catalytic Triad Residues Thr-His-Glu. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 268-274, 2010.

OHKUMA, M. Termite symbiotic systems: efficient bio-recycling of lignocellulose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, n. 61, p. 1–9, 2003.

OHKUMA, M.; KUDO, T. Phylogenetic diversity of the intestinal bacterial community in the termite *Reticulitermes speratus*. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 62, p. 461-468, 1996.

OLIVEIRA, N. A. et al. Extracellular hydrolytic enzymes in indigenous strains of rhizobia in Central Amazonia, Amazonas, Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006a.

OLIVEIRA, A. N. et al. Enzymatic activity of native Central Amazonian rhizobia strains grown in different levels of acidity. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 204-210, 2006b.

OLIVEIRA, A. N.; FLOR, N. S.; OLIVEIRA, L. A. Influência do pH e temperatura sobre a atividade amilolítica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 2, p. 401-404, 2010.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 66, n. 1, p. 25-40, 1998.

PARRA, J. R. P. Controle das principais pragas da cana-de-açúcar. In: CÂMARA, G. M. S.; OLIVEIRA, E. M. (Eds.). **Produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993. p. 184-197.

PETSCHACHER, B.; NIDETZKY, B. Altering the coenzyme preference of xylose reductase to favor utilization of NADH enhances ethanol yield from xylose in a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, London, v. 7, n. 9, 2008.

PISKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 22, p. 183–186, 2006.

PITKÄNEN, S. P. et al. Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic Engineering**, Amsterdam, v. 5, p. 16-31, 2003.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, R. S.; HOB, P. J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, Guntur, v. 3, n. 1, p. 8-36, 2009.

PREZIOSI-BELLOY, C.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from aspen wood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, Berlin, v. 22, p. 239–243, 2000.

PRUITT, K. D. et al. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 35, p. 61-65, 2007.

QI, W.; CHEN, C-L; WANG, J-Y. Reducing sugar-producing bacteria from guts of *tenebrio molitor* linnaeus (yellow mealworm) for lignocellulosic waste minimization. **Microbes and Environments**, Amsterdam, v.26, n. 4, p. 354–359, 2011.

RALPH, J. Cell wall cross-linking in grasses: the importance of understanding plant chemistry and biochemistry. In: SATTER, L. D. (Ed.). **Informational Conference**



**with Dairy and Forage Industries.** Madison: Dairy Forage Research Center, 1996. p. 1.

RAO, R. S., BHADRA, B., SHIVAJI, S. Isolation and characterization of xylitol-producing yeasts from the gut of coleopterian insects. **Current Microbiology**, Berlin, v. 55, n. 5, p. 441-446, Nov., 2007.

REZAEI, F. et al. Simultaneous cellulose degradation and electricity production by *enterobacter cloacae* in a microbial fuel cell. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, n. 11, p. 3673-3678, 2009.

RIVERA, F. N. et al. yeasts associated with bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae): molecular identification and biochemical characterization. **RMRS Proceedings**, Cambridge, p. 45-48, 2007.

RIVERA, F. N. et al. Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera : Curculionidae : Scolytinae). **Biological Journal of the Linnean Society**, New York, v. 98, p. 325–342, 2009.

ROSA, C. A. et al. *Clavispora opuntiae* and other yeasts associated with the moth *Sigalgaita* sp. in the cactus *Pilosocereus arrabidaei* of Rio de Janeiro, Brazil **Antonie Van Leeuwenhoek**, Berlin, v. 62, n. 4, p. 267-272, 1992.

ROSA, C. A. et al. *Kodamaea nitidulidarum*, *Candida restingae*, and *Kodamaea anthophila*, three new related yeast species from ephemeral flowers. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, p. 309–318, 1999.

SAITOU N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 4, p. 406-425, 1987.

SALDARRIAGA, J. J. **Caracterização das comunidades de microrganismos associados ao mesêntero de *Diatraea saccharalis* e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Crambidae e Noctuidae).** 2009. 144 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

SALEH, A. A, et al. Construction of various mutants of xylose metabolizing enzymes for efficient conversion of biomass to ethanol. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 50, p. 279-280, 2006.

SALES, B. B. **Construção de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes superexpressoras de transportadores de pentoses.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SÁNCHEZ, Ó. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, p. 5270–5295, 2008.

SANDERSON, K. Us biofuels: a field in ferment. **Nature**, London, v. 444, p. 673–676, 2006.

SAXENA, S.; BAHADUR, J.; VARMA, A. Cellulose and hemicellulose degrading bacteria from termite gut and mound soils of India. **Indian Journal of Microbiology**, Berlin, v. 33, p. 55-60, 1993.

SCHAFER, A. et al. Hemicellulose-degrading bacteria and yeasts from the termite gut. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, v. 80, p. 471-478, 1996.

SCHNEIDER, H. Conversion of pentoses to ethanol by yeast and fungi. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 9, p. 1–40, 1989.

SCHULTZ, J. E.; BREZNAK, J. A. Heterotrophic bacteria present in hindguts of wood-eating termites [*Reticulitermes flavipes* (Kollar)]. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, n. 37, p. 1206-1210, 1978.

SENE, L. et al. Effect of environmental conditions on Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 84-86, p. 371-380, 2000.

SILVA, et al. Purification and characterization of a low molecular weight xylanase from solid-state cultures of *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, n. 2, 1999.

SILVA, S. S. et al. Maximizing the xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 63-64, p. 557-563, 1997.

SILVA, C. J. S. M.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench bioreactor. **Journal of Food Engineering**, Amsterdam, v. 75, p. 115-119, 2006.

SMIT, E. et al. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing cloned pcr- amplified genes encoding 18S r RNA and temperature gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, p. 2614-2621, 1999.

SOKOLOVSKY, V. et al. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics Newsletters**, College Station, v. 37, p. 39-40, 1990.

SREENIVAS, R. R. et al. Xylitol production by *Candida* sp.: parameter optimization using Taguchi approach. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 39, p. 951-956, 2004.

SREENIVAS R. R. et al. Xylitol strain improvement of *Candida tropicalis* for the production of xylitol: Biochemical and physiological characterization of wild and mutant strain CT-OMV5. **Journal of Microbiology**, Berlin, v. 44, p. 113–120, 2006a.

SREENIVAS R. R. et al. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 97, p. 1974-1978, 2006b.

SREENIVAS, R. R. et al. *Candida hyderabadensis* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from wine grapes. **FEMS Yeast Research**, London, v. 7, p.489–493 2007a.

SREENIVAS, R. R. et al. Isolation and Characterization of Xylitol-Producing Yeasts from the Gut of Coleopteran Insects. **Current Microbiology**, Berlin, v. 55, p. 441–446, 2007b.

SREENIVAS, R. R. et al. Cloning and expression of XYL1 gene encoding for D-xylose reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v, 10, p. 91-99, 2007c.

SREENIVAS, R. R. et al. *Candida northwykensis* sp. nov.: a novel yeast isolated from the gut of the click beetle *Melanotus villosus*. **Current Microbiology**, Berlin, v. 63, n. 2, p.115-120, 2011.

STAMFORD, T. L. M.; ARAÚJO, J. M.; STAMFORD, N. P. Enzymatic Activity of microorganisms isolated from yam bean legume (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) (*Pachyrhizus erosus* L. Urban). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 8, p. 382-385, 1998.

STARMER, W. T.; FOGLEMAN, J. C.; LACHANCE, M.-A. The yeast community of cacti. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer, 1991. p. 158–178.

STEINHAUS, E. A. The importance of environmental factors in the insect–microbe ecosystem. **Bacteriological Reviews**, v. 24, p. 365–373, 1960.

STERNBERG, D.; DORVAL, S. Cellulaseproduction and ammonia metabolism in *Trichoderma reesei* on high levels of cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 21, p. 181- 191, 1979.

SUH, S. O.; NODA, H.; BLACKWELL, M. Insect symbiosis: derivation of yeast-like endosymbionts within an entomopathogenic filamentous lineage. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 6, p. 995-1000, 2001.

SUH, S. O. et al. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeast. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 3137–3146, 2003.

SUH, S. O.; BLACKWELL, M. Four new yeasts in the *Candida mesenterica* clade associated with basidiocarp-feeding beetles. **Mycologia**, v. 97, n. 1, p. 167–177, 2005.

SUH, S. O.; NGUYEN, H. N.; BLACKWELL, M. Nine new *Candida* species near *C. membranifaciens* isolated from insects. **Mycology Research**, Amsterdam, v. 109, p. 1045–1056, 2005a.

SUH, S. O. et al. The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts. **Mycology Research**, Amsterdam, v. 109, p. 261–265, 2005b.

SUN, J. Z.; ZHOU, X. G. Utilization of lignocelluloses feeding insects for viable biofuels: an emerging and promising area of entomological science. **Recent Advances in Entomological Research**, p. 251–291, 2009.

SUN, J. Z.; SCHARF, M. E. Exploring and integrating cellulolytic systems of insects to advance biofuel technology. **Journal of Insect Science**, v. 17, p. 163–165, 2010.

TAMURA K., et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAN, S. S.; LI, D. Y.; JIANG, Z. Q.; ZHU, Y. P.; SHI, B.; LI, L. T. Production of xylobiose from the autohydrolysis explosion liquor of corncob using *Thermotoga maritima* xylanase B (XynB) immobilized on nickel-chelated Eupergit C. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 1, p. 200-204, 2008.

TERÁN, F. O. NOVARETTI, W. R. T.; KASTEN, P. *Migdolus* sp. e insetos associados. In: SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA, 2., 1984, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Copersucar, 1984. p. 25- 31.

TERÁN, F. O.; NOVARETTI, W. R. T.; KASTEN, P. *Migdolus* sp. e insetos associados. **Pragas da cultura da cana-de-açúcar**. Piracicaba: Copersucar, 1983. p. 25-31.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109B, n. 1, p. 1-62, 1994.

THANH, V. N.; HAI, HAI, D. A.; LACHANCE, M.-A. *Issatchenkia hanoiensis*, a new yeast species isolated from frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha cramerella* Snellen. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 113-117, 2003.

THANH, V. N.; HAI, HAI, D. A.; LACHANCE, M.-A. *Cryptococcus bestiolae* and *Cryptococcus dejecticola*, two new yeast species isolated from frass of the litchi fruit borer *Conopomorpha sinensis* Bradley. **FEMS Yeast Research**, v. 6, n.2, p. 298-304, 2006.

TOKUDA, G.; WATANABE, H. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. **Biology Letters**, v. 3, p. 336– 339, 2007.

VAN DIJKEN, J. P. et al. Alcoholic fermentation by “non-fermentative” yeasts. **Yeast**, v. 2, p. 123–127, 1986.

VARMA, A. et al. Lignocellulose degradation by microorganisms from termite hills and termite guts: a survey on the present state of art. **Microbiology Reviews**, v. 15, p. 9-28, 1994.

VAUGHAN-MARTINI, A.; KURTZMAN, C. P.; MEYER, S. A.; O'NEILL, E. B. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascospore state of *Candida fermentati*, and *Candida carpophila* sp. nov. **FEMS Yeast Research**, v. 5, p. 463-469, 2005.

VEGA, F. E.; DOWD, P. F. The role of yeast as insect endo- symbionts. In: VEGA, F. E.; BLACKWELL, M. (Ed.). **Insect-fungal associations: ecology and evolution** d) Oxford: Oxford University Press, 2005. p. 211–243.

VISÔTTO, L. E. **Contribuição da microbiota bacteriana para o processo digestivo e desenvolvimento da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*) e caracterização de bactérias proteolíticas associadas ao seu trato intestinal**. 2007, 110 f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

WALKER, A. J.; GLEN, D. M.; SHEWRY, P. R. Bacteria associated with the digestive system of the slug *Deroceras reticulatum* are not required for protein digestion. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 1387-1394, 1999.

WARD, O. P.; SINGH, A. Bioethanol technology: developments and perspectives. **Advances in Applied Microbiology**, v. 51, p. 53–80, 2002.

WARNECKE, F. et. al. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, London, v. 450, p. 560– 565, 2007.

WATANABE, H.; TOKUDA G. Cellulolytic systems in insects. **Annual Reviews Entomology**, v. 55, p. 609-632, 2010.

WENZEL, M. et al. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 32–40, 2002.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A. et al. (Ed.). **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 315-322.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of dxylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, 24–37, 1998.

WONG, S. S. et al. Biotyping of *Penicillium marneffe* Reveals Concentration-Dependent Growth Inhibition by Galactose. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, n. 4, p.1416-21, 2001.

YAMAGUCHI, T.; ISHIDA, M.; SUZUKI, T. Biodegradation of hydrocarbons by *Prototheca zopfii* in rotating biological contactors. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 403-409, 1999.

YOSHITAKE, J. et al. (Production of polyalcohol by *Corynebacterium* sp. I. Production of pentitol from aldopentose. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 35, p. 905-911, 1971.

YOSHITAKE, J. et al. Xylitol production by *Enterobacter liquefaciens*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, p. 1493-1503, 1976.

ZHANG, N.; SUH, S. O.; BLACKWELL, M. Microorganisms in the gut of beetles: evidence from molecular cloning. **Journal of Invertebrates Pathology** , v. 84, p. 226–233, 2003.

## APÊNDICE





## APÊNDICE A

**Tabela 12** – Porcentagem de identidade entre as sequências de isolados identificados como *Meyerozyma guilliermondii* pelo BLAST para isolados de *Migdolus fryanus*

	L	L1	L4	L5	L10	L12	L13	L15	L16	L19	L20	L21	L23	L24	L27	L80	L82	L83	L84	L85
L1	95.8																			
L4	99.1	96.4																		
L5	99.1	96.4	100.0																	
L10	97.3	97.3	97.6	97.6																
L12	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6															
L13	99.4	96.4	99.7	99.7	97.9	99.7														
L15	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7													
L16	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0												
L19	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0											
L20	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0										
L21	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0									
L23	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0								
L24	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0							
L27	97.9	95.5	98.8	98.8	96.4	98.8	98.5	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8						
L80	98.8	96.4	99.7	99.7	97.3	99.7	99.4	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.1					
L82	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.7				
L83	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.7	100.0			
L84	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.7	100.0	100.0		
L85	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.7	100.0	100.0	100.0	
L88	100.0	95.8	99.1	99.1	97.3	99.1	99.4	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	97.9	98.8	99.1	99.1	99.1	99.1

**Tabela 13** – Porcentagem de identidade entre as sequências de isolados identificados como *Meyerozyma guilliermondii* pelo BLAST para isolados de *Diatraea saccharalis*

	L92	L93	L94	L96	L97	L98	L99	L101	L108	L109	L111	L112	L115	L118	L121	L122	L123	L124	L125	L127	L133	L134
<b>L93</b>	100.0																					
<b>L94</b>	100.0	100.0																				
<b>L96</b>	98.8	98.8	98.8																			
<b>L97</b>	95.5	95.5	95.5	94.9																		
<b>L98</b>	100.0	100.0	100.0	98.8	95.5																	
<b>L99</b>	98.5	98.5	98.5	98.8	95.2	98.5																
<b>L101</b>	99.1	99.1	99.1	98.8	95.2	99.1	97.6															
<b>L108</b>	93.1	93.1	93.1	94.0	91.5	93.1	92.1	6.9														
<b>L109</b>	100.0	100.0	100.0	98.8	95.5	100.0	98.5	99.1	93.1													
<b>L111</b>	99.4	99.4	99.4	98.2	95.5	99.4	97.9	98.5	92.7	99.4												
<b>L112</b>	100.0	100.0	100.0	98.8	95.5	100.0	98.5	99.1	93.1	100.0	99.4											
<b>L115</b>	99.7	99.7	99.7	98.5	95.2	99.7	98.2	98.8	93.4	99.7	99.1	99.7										
<b>L118</b>	98.2	98.2	98.2	97.0	94.3	98.2	97.0	97.3	91.5	98.2	98.8	98.2	97.9									
<b>L121</b>	100.0	100.0	100.0	98.8	95.5	100.0	98.5	99.1	93.1	100.0	99.4	100.0	99.7	98.2								
<b>L122</b>	100.0	100.0	100.0	98.8	95.5	100.0	98.5	99.1	93.1	100.0	99.4	100.0	99.7	98.2	100.0							
<b>L123</b>	100.0	100.0	100.0	98.8	95.5	100.0	98.5	99.1	93.1	100.0	99.4	100.0	99.7	98.2	100.0	100.0						
<b>L124</b>	98.8	98.8	98.8	98.8	94.3	98.8	97.3	98.4	93.1	98.8	98.2	98.8	98.5	97.0	98.8	98.8	98.8					
<b>L125</b>	98.2	98.2	98.2	97.6	94.6	98.2	96.7	97.8	94.0	98.2	97.6	98.2	97.9	96.4	98.2	98.2	98.2	98.2				
<b>L127</b>	99.1	99.1	99.1	97.9	94.9	99.1	97.9	98.2	92.1	99.1	98.5	99.1	98.8	97.3	99.1	99.1	99.1	97.9	97.3			
<b>L133</b>	99.7	99.7	99.7	98.5	95.5	99.7	98.5	98.8	92.7	99.7	99.1	99.7	99.4	97.9	99.7	99.7	99.7	98.5	97.9	99.4		
<b>L134</b>	95.5	95.5	95.5	94.9	100.0	95.5	95.2	4.8	91.5	95.5	95.5	95.5	95.2	94.3	95.5	95.5	95.5	94.3	94.6	94.9	95.5	
<b>L135</b>	95.8	95.8	95.8	94.6	95.5	95.8	94.3	5.1	91.2	95.8	95.8	95.8	95.5	94.6	95.8	95.8	95.8	94.6	94.9	94.9	95.5	95.5



**Tabela 16** – Porcentagem de identidade entre as sequências de isolados identificados como *Candida pseudointermedia* pelo BLAST para isolados de *Diatraea saccharalis*

	L100	L102	L103	L113	L114
L102	100.0				
L103	94.6	94.6			
L113	98.7	98.7	93.3		
L114	100.0	100.0	94.6	98.7	
L119	100.0	100.0	94.6	98.7	100.0

**Tabela 17** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candida intermedia* pelo BLAST para isolados de *Telchin licus licus*

[illegible]

**Tabela 18** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candida intermedia* pelo BLAST para isolados de *Mygdolus fryanus*

	L3
L6	99.6

**Tabela 19** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candida intermedia* pelo BLAST para isolados de *Diatraea saccharalis*

	L104
L130	92.4

**Tabela 20** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candida intermedia* pelo BLAST para isolados de *Sphenophorus levis*

	L41	L43	L46
L40	100.0		
L41	100.0	100.0	
L43	99.1	99.1	99.1

**Tabela 21** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candida sorboxylosa* pelo BLAST para isolados de *Sphenophorus levis*

	L44	L47
L47	91.5	
L49	98.2	93.3

**Tabela 22** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candida tropicalis* pelo BLAST para isolados de *Diatraea saccharalis*

	L105	L116
L116	100.0	
L117	89.2	89.2

**Tabela 23** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candida parapsilosis* pelo BLAST para isolados de *Telchin licus licus*

	L63
L66	100

**Tabela 24** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candida solani* pelo BLAST para isolados de *Telchin licus licus*

	L56
L70	82.1

**Tabela 25** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Pichia sp.* pelo BLAST para isolados de *Telchin licus licus*

	L53	L57	L58	L59	L76
L51	100.0				
L53	100.0	100.0			
L57	100.0	100.0	100.0		
L58	99.6	99.6	99.6	99.6	
L59	100.0	100.0	100.0	100.0	99.6

**Tabela 26** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Scheffersomyces sartinae* pelo BLAST para isolados de *Sphenophorus levis*

	L35
L33	100

**Tabela 27** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Scheffersomyces sartinae* pelo BLAST para isolados de *Telchin licus licus*

	L54
L81	96.4

**Tabela 28** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Tremella globispora* pelo BLAST para isolados de *Diatraea saccharalis*

	L91
L95	100

**Tabela 29** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Cryptococcus laurentii* pelo BLAST para isolados de *Migdolus fryanus*

	L7	L22	L78
L22	98.6		
L78	98.6	100.0	
L79	98.6	100.0	100.0



**Tabela 30** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candia intermedia* pelo BLAST para isolados de *Migdolus fryanus*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis*

**bela 32** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candida tropicalis* pelo BLAST para isolados de *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis*

	L62
L105	100.0
L116	100.0
L117	89.2

**Tabela 33** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Candida tropicalis* pelo BLAST para isolados de *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis*

	L7	L22	L78
L22	98.6		
L78	98.6	100.0	
L79	98.6	100.0	100.0

**Tabela 34** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Aureobasidium pullulans* pelo BLAST para isolados de *Migdolus fryanus*, *Telchin licus licus* e *Diatraea saccharalis*

	L107	L120	L90
L87	98.9	98.0	98.7
L90		99.1	99.8
L107			99.3

	L28	L29	L30	L31	L32	L36	L37	L38	L48	L_	L1	L10	L12	L13	L15	L16	L19	L20	L21	L23	L24	L27	L4	L5	L80	L82	L83	L84	L85	L88
L92	99.4	97.6	99.4	99.4	99.4	100.0	100.0	99.7	87.3	100.0	99.1	100.0	100.0	96.4	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.7	100.0	100.0	100.0	99.1	
L93	99.4	97.6	99.4	99.4	99.4	100.0	100.0	99.7	87.3	100.0	99.1	100.0	100.0	96.4	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.7	100.0	100.0	100.0	99.1	
L94	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	99.1	100.0	100.0	96.4	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.7	100.0	100.0	100.0	99.1	
L96	98.2	97.9	98.2	98.2	98.2	98.8	98.8	98.5	87.3	98.5	95.5	98.8	98.8	97.0	98.8	99.1	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8	97.9	98.5	98.8	98.8	98.8	98.5	
L97	94.9	94.9	94.9	94.9	94.9	95.5	95.5	95.5	83.1	95.2	95.8	95.5	95.5	97.3	95.5	95.8	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	95.5	94.6	95.5	95.5	95.5	95.5	95.2	
L98	99.4	97.6	99.4	99.4	99.4	100.0	100.0	99.7	87.3	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.7	100.0	100.0	100.0	99.1	
L99	97.9	96.7	97.9	97.9	97.9	98.5	98.5	98.5	85.8	97.6	95.8	98.5	98.5	96.1	98.5	98.2	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	97.6	98.5	98.5	98.5	98.5	97.6	
L101	98.5	98.5	98.5	98.5	98.5	99.1	99.1	98.8	87.0	98.8	96.4	99.1	99.1	97.3	99.1	99.4	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	99.1	98.5	98.8	99.1	99.1	99.1	98.8	
L108	92.4	93.4	92.4	92.4	92.4	93.1	93.1	92.7	87.0	92.7	90.6	93.1	93.1	92.1	93.1	93.4	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	93.1	92.1	92.7	93.1	93.1	93.1	92.7	
L109	99.4	97.6	99.4	99.4	99.4	100.0	100.0	99.7	87.3	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.7	100.0	100.0	100.0	99.1	
L111	98.8	97.0	98.8	98.8	98.8	99.4	99.4	99.1	87.0	97.3	95.2	98.2	98.2	96.4	98.2	97.9	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	97.0	97.9	98.2	98.2	98.2	97.3	
L112	99.4	97.6	99.4	99.4	99.4	100.0	100.0	99.7	87.3	98.8	96.1	99.7	99.7	97.3	99.7	99.4	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	99.7	98.5	99.4	99.7	99.7	99.7	98.8	
L115	99.1	97.3	99.1	99.1	99.1	99.7	99.7	99.4	87.0	99.1	96.4	100.0	100.0	97.6	100.0	99.7	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	98.8	99.7	100.0	100.0	100.0	99.1	
L118	97.6	95.8	97.6	97.6	97.6	98.2	98.2	97.9	86.1	98.5	96.4	99.4	99.4	97.6	99.4	99.1	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	99.4	98.2	99.1	99.4	99.4	99.4		

**Tabela 35** – Porcentagem de identidade entre as sequências identificadas como *Meyerozyma guilliermondii* pelo BLAST para isolados de *Migdolus fryanus*, *Sphenophorus levis* e *Diatraea saccharalis*

[illegible]